UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLWANDSYNTHESE AN PROTOPLASTEN UND ZELLKULTUREN VON DAUCUS CAROTA L.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HANS-PETER MOCK
aus Bad Schussenried
1986

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLWANDSYNTHESE

AN PROTOPLASTEN UND ZELLKULTUREN

VON *DAUCUS CAROTA* L.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

HANS-PETER MOCK

aus Bad Schussenried

1987

Tag der mündlichen Prüfung : 19.12.1986

Dekan:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter :	Prof. Dr. H.U. Seitz
2. Berichterstatter :	Prof. Dr. A. Hager

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	Funktionen der Zellwand	1
	Chemischer Aufbau der Zellwand	2
	Zellwand-Modelle	5
	Zellwandsynthese	8
	Regulation der Synthese und Modifikationen der Zellwand	12
	Problemstellung	14
II.	MATERIAL UND METHODEN	17
1.	Versuchsobjekt	17
2.	Isolierung von Protoplasten	17
3.	Kultur von Protoplasten	18
4.	Bestimmung der Vitalität und Beobachtung der Zellwandregeneration bei Protoplasten	19
4.1.	Vitalitätstest mit Phenosafranin nach FERRARI et al. (1975)	19
4.2.	Beobachtung der Zellwandregeneration mit Calcofluor White ST	19
4.3.	Beobachtung der Zellwandregeneration mit SDS-Phenosafraninlösung	19
5.	Zellzahlbestimmung bei Protoplasten	20
6.	Zellzahlbestimmung und weitere Parameter zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Suspensionszellen	20
6.1.	Zellzahlbestimmung bei Suspensionszellen	20
6.2.	Frischgewicht	20
6.3.	Trockengewicht	21
6.4.	Gepacktes Zellvolumen ("PCV")	21
7.	Isolierung der Zellwand von Suspensionszellen oder regenerierenden Protoplasten	21

8.	Isolierung der extrazellulären Polysaccharide (ECP) und Glycoproteine aus dem Kulturfiltrat von Suspensionszellen oder dem Medium regenerierender Protoplasten	23
9.	Untersuchung der isolierten Zellwände und extrazellulären Komponenten	23
9.1.	Phenol-Schwefelsäure-Test (DUBOIS et al., 1956)	23
9.2.	Hydroxybiphenylmethode zur Bestimmung von Uronsäuren nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973)	24
9.3.	Bestimmung von Cellulose nach UPDEGRAFF (1969)	24
9.4.	Bestimmung von Hydroxyprolin nach DRODZD et al. (1976) bzw. WIENECKE et al. (1982)	25
9.5.	Gaschromatographische Analyse der Polysaccharide: Bestimmung der Monosaccharide als Alditolacetate nach HARRIS et al. (1984) und EMMERLING (1986)	26
9.5.1.	Aufarbeitung	26
9.5.2.	Gaschromatographische Bedingungen	27
9.5.3.	Identifizierung der Alditolacetate	27
9.5.4.	Quantifizierung der Alditolacetate	27
9.6.	Fraktionierung der Zellwand- und extrazellulärer Polysaccharide	28
9.7.	Versuche mit einem Yariv-Reagenz und Extraktion von Extensin aus der Zellwand	29
9.7.1.	Synthese des ß-Galactosyl-Yariv-Reagenzes nach YARIV et al. (1962)	29
9.7.2	Präzipitation mutmaßlicher Arabinogalactan-Proteine aus dem Kulturfiltrat von Suspensionszellen oder aus dem Medium regenerierender Protoplasten	31
9.7.3.	Extraktion von Extensin aus der Zellwand von Suspensionszellen nach SELVENDRAN et al. (1975)	31
10.	Trennung von Membranen über lineare Dichtegradienten	32

10.1.	Isolierung von Protoplasten	32
10.2.	Homogenisierung	32
10.2.1.	Protoplasten	32
10.2.2.	Suspensionszellen	33
10.3.	Lineare Dichtegradienten	33
11.	Isolierung von Membranen aus Protoplasten mit Hilfe von "microbeads"	34
11.1.	Isolierung und Reinigung der Protoplasten	34
11.2.	Behaften ("Coating") der Protoplasten mit "microbeads" und Neutralisation überschüssiger Ladungen	34
11.3.	Homogenisierung	36
11.4.	Trennung der Membranen aus der Lysat mit verschiedenen Zentrifugationstechniken	36
11.5.	Markierung der Protoplasten-Oberfläche mit radioaktivem Concanavalin A	36
12.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	37
12.1.	ATPase nach LIN und MORALES (1977)	37
12.2.	Cytochrom C-Oxidase (E.C. 1.9.3.1.)	38
12.3.	Cytochrom C-Reduktase	38
12.4.	Glucosyltransferasen	39
12.5.	IDPase	39
12.6.	UDPG-Steroyl-Glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.35.)	40
13.	Proteinbestimmung	41
14.	Bestimmung der Saccharose-Konzentration	41
15.	Medien, Puffer und Lösungen	41
15.1.	Medien	41
15.1.1.	Medium für die Suspensionskultur	41
15.1.2.	Medium für die Protoplastenisolierung (PI-3)	42

15.1.3. Medium für die Protoplastenkultur (PC-6) 43

15.1.4. Medium PI-3B 43

15.1.5. Medium PI-3S 43

15.2. Puffer und Lösungen 44

16. Chemikalien und Verbrauchsmaterial 47

16.1. Chemikalien 47

16.2. Verbrauchsmaterial 49

17. Abkürzungen 50

III. ERGEBNISSE 52

A) Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei Suspensionszellen und regenerierenden Protoplasten 52

1. Charakterisierung der verwendeten Zellinie DC_{81} 52

2. Untersuchungen zur Zellwand und den extrazellulären Polysacchariden von Suspensionszellen 54

2.1. Menge an Zellwandmaterial im Verlauf der Kultivierung 54

2.2. Extrazelluläre Polysaccharide im Verlauf der Kultivierung 55

2.3. Weitere Charakterisierung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide von Suspensionszellen 57

2.3.1. Zuckerzusammensetzung der Zellwand 57

2.3.2. Neutrale Monosaccharide der extrazellulären Polysaccharide 57

2.3.3. Fraktionierung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide in Pektin, Hemicellulose und Cellulose 59

3. Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei regenerierenden Protoplasten 64

3.1. Zeitlicher Verlauf der Zellwand-Regeneration 64

3.2.	Anmerkungen zur Methodik der Zellwand-Isolierung	66
3.3.	Nähere Charakterisierung der Zellwände und extrazellulären Polysaccharide von regenerierenden Protoplasten	68
3.3.1.	Neutrale Monosaccharide der Zellwand	68
3.3.2.	Neutrale Monosaccharide der extrazellulären Polysaccharide	70
3.3.3.	Fraktionierung der Zellwand von regenerierenden Protoplasten	71
3.4.	Einfluß von DMSO auf die Bildung der Zellwand und extrazellulärer Polysaccharide im Verlauf der Kultivierung	71
3.5.	Hydroxyprolinhaltige Glycoproteine der Zellwand und des Kulturfiltrates	74
B) Trennung	von Membranen aus Protoplasten und Suspensionszellen von *Daucus carota*	81
1.	Trennung der Membranen über lineare Gradienten	83
2.	Trennung von Membranen mit Hilfe von "microbeads"	93
2.1.	Optimieren der Bedingungen für das Anheften der "microbeads" an Protoplasten	95
2.2.	Einfluß der Menge an "microbeads" und Polyacrylsäure auf das Verteilungsmuster von Leitenzymen bei einfacher Zentrifugation des Lysates	96
2.3.	Belege für die Wirksamkeit der "microbeads" und weitere Verbesserungen der Methodik	98
2.3.1.	Differentielle Zentrifugation des Lysates	98
2.3.2.	Zentrifugation des Lysates über eine Stufe aus 45 % (w/w) Saccharose	100
2.4.	Reinigung der Plasmamembran mit Hilfe von "microbeads"	110

IV. DISKUSSION 124

A) Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei Suspensionszellen und regenerierenden Protoplasten 124

1. Charakterisierung der für die Untersuchungen verwendeten Zellinie DC_{b1} 124

2. Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide von Suspensionszellen 125

3. Untersuchungen zu Zellwand und extrazellulären Polysacchariden bei regenerierenden Protoplasten 130

4. Hydroxyprolinhaltige Glycoproteine der Zellwand und des Kulturfiltrates 134

B) Trennung von Membranen aus Suspensionszellen und Protoplasten von *Daucus carota* 137

1. Trennung von Membranen über linearen Gradienten 137

2. Trennung von Membranen mit Hilfe von "microbeads" 141

2.1. Belege für die Wirksamkeit der "microbeads" und Optimierung der Methodik 141

2.2. Reinigung der Plasmamembran mit Hilfe der "microbeads"-Technik 144

2.3. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Trennung der Membranen 147

2.4. Spezifische Aktivitäten der Glucansynthase II in Rohhomogenaten der Zellinie DC_{b1} 148

V. ZUSAMMENFASSUNG 149

VI. LITERATUR 154

I. EINLEITUNG

Funktionen der Zellwand

Die meisten pro- und eukaryotischen Zellen weisen Substanzen außerhalb des Protoplasten auf. Dabei finden sich charakteristische Unterschiede, die verschiedene Strategien und Anpassungen in der Evolution widerspiegeln. Während Tiere meist Proteine und Glycoproteine wie z.B. Kollagen als interzelluläre Matrix besitzen, haben Pflanzenzellen eine komplizierte, den jeweiligen Erfordernissen entsprechend vielfältig abgeänderte Wand, die hauptsächlich aus Polysacchariden besteht. Die Zellwand gilt, neben den Plastiden und der damit verbundenen Fähigkeit, CO_2 zu fixieren, als typisches Charakteristikum der pflanzlichen Zellen. Sie erfüllt sowohl für die einzelne Zelle als auch im Aufbau der Pflanze wichtige Aufgaben.
So fungiert die Zellwand als Gegenspieler des osmotischen Druckes, der von den Vakuolen erzeugt wird. Dabei ist die Gestalt der Zellwand der Funktion der jeweiligen Zellen angepaßt. Es sind vielfache Abwandlungen möglich, die der Aufgabe der Zelle im Gewebe oder ganzen Organismus gerecht werden. Cystolithen sind ein Beispiel für eine morphologisch bemerkenswerte Ausbildung der Zellwand. Selektive Wandverdickungen oder Aussparungen führen zu Tracheen, Tracheiden und Tüpfeln. Auch die charakteristische Struktur der Oberfläche von Pollenkörnern läßt sich auf ähnliche Mechanismen zurückführen. Zusätzlich erfolgt eine Akkrustation von Sporopollenin; dadurch wird die chemische Widerstandsfähigkeit beträchtlich erhöht. Auch Stein- und Korkzellen machen deutlich, wie die Form der Zellwand den Funktionen entsprechend abgewandelt werden kann.
Damit sind weitere Aufgaben angesprochen: die Zellwand trägt zum Schutz vor mechanischen und chemischen Verletzungen bei, ermöglicht die Fähigkeit, Leitgewebe auszubilden und hilft bei der Abwehr von Schadorganismen. So können definierte

Bruchstücke der Zellwand, die durch die Einwirkung von Enzymen pathogener Organismen freigesetzt werden, als Elicitoren der Phytoalexin-Synthese dienen (Übersichtsartikel von DARVILL und ALBERSHEIM, 1984). Als Reaktion auf Elicitoren können auch spezifische Komponenten der Zellwand neu synthetisiert werden., z.B. Glycoproteine, die einen hohen Anteil an Hydroxyprolin haben (ESQUERRE-TUGAYE et al., 1985). In Bohnen ist Zugabe eines Elicitors die Prolyl-Hydroxylase Aktivität erhöht (BOLWELL et al., 1985b).
Die Zellwand vermittelt ebenfalls den Zusammenhalt der Zellen im Gewebe; die Mittellamelle ist durch einen besonders hohen Gehalt an Pektinen und einen niedrigen Gehalt an Cellulose gekennzeichnet.
Weiterhin können in der Zellwand von Samen auch Reservepolysaccharide gespeichert werden. Bei der Dattel finden sich Mannane, bei *Tropaeolum* Xyloglucane (Übersichtsartikel von REID, 1985). Diese Reservestoffe werden bei der Samenkeimung durch abbauende Enzyme wieder mobilisiert (EDWARDS et al., 1986).

Chemischer Aufbau der Zellwand

Die vielfältigen Anpassungen der Zellwand an verschiedene Funktionen spiegeln sich nicht nur morphologisch, sondern auch im chemischen Aufbau der Zellwand wieder. Bei der Verholzung werden Polymere aus Phenylpropanen als Lignin in die Zellwand eingelagert. Dies bedeutete in der Evolution der Landpflanzen einen wichtigen Schritt, der höhere Festigkeit erbrachte und die Leitung von Wasser über große Strecken ermöglichte.
Die Akkrustation von Suberin, Cutin und Wachsen trägt zum Schutz vor Wasserverlusten bei. Weiterhin können Mineralstoffe wie z.B. Silicate in die Zellwand eingelagert werden.
Als primäre Bestandteile gelten jedoch vor allem verschiedene Fraktionen der Polysaccharide und Glycoproteine.

Polysaccharide werden in Pektine, Hemicellulosen und Cellulose eingeteilt. Diese Klassifizierung beruht zunächst auf dem angewendeten Extraktionsverfahren. Damit sind je nach den gewählten Bedingungen , z.B. zur Extraktion von Pektinen (heißes Wasser, Ammoniumoxalat, EDTA oder CDTA), Unterschiede möglich. Nach DARVILL et al. (1980) ist diese Einteilung aber hinreichend genau.
Die Fraktionen der Polysaccharide sind nicht homogen. Sie bestehen aus verschiedenen Bausteinen, die selbst mehr oder weniger komplexe Polysaccharide sind, deren genaue Struktur nicht immer vollständig aufgeklärt ist.
Als charakteristisch für die Pektine gelten Rhamnogalacturonan I und II, Homogalacturonan, Araban und Galactan, als Bausteine der Hemicellulosen z.B. Xylane und Xyloglucane.
Viele der Bausteine enthalten neben den namensgebenden Zukkern weitere Monomere in verschiedenen Anteilen mit unterschiedlichen Bindungstypen. Dies erschwert die Aufklärung der Strukturen im Detail und erfordert eine zunehmende Verfeinerung der Analysetechniken, zumal von einigen Komponenten nur geringe Mengen zur Verfügung stehen (Überblick bei SELVENDRAN, 1985). So erbrachte eine neue Untersuchung von Rhamnogalacturonan I, daß das "Rückgrat" aus Einheiten eines Diglycosides aus Galacturonsäure und Rhamnose zusammengesetzt ist (LAU et al., 1985) In Rhamnogalacturonan II wurde der bis dahin nur bei Bakterien gefunden Zucker KDO nachgewiesen (YORK et al., 1985; MELTON et al., 1986).
Die Anteile der Bausteine in der Zellwand können von Art zu Art schwanken. Bemerkenswert sind einige Unterschiede von Mono- und Dikotyledonen. Bei Monokotyledonen ist der Anteil von Pektinen in der Primärwand wesentlich niedriger als bei Dikotyledonen. Ebenso verschiebt sich in der Hemicellulose-Fraktion von Monokotyledonen der Anteil an Xyloglucanen zugunsten von Xylanen. Es ist nicht bekannt, welche Bedeutung diese Unterschiede für die Pflanzen haben.
Auch der Gehalt an Cellulose in der Zellwand ist sehr variabel; er reicht von etwa 8 – 10 % in einigen Zellkulturen

oder regenerierenden Protoplasten bis über 60 % in der Sekundärwand; bei Samenhaaren der Baumwolle erreicht er sogar 98 %.

Außer Kohlenhydraten findet man Proteine als Bestandteil der Zellwand, darunter häufig Glycoproteine. Von diesen hat Extensin mit bis zu 10 % der Zellwandmasse den größten Anteil. Auch in diesem Fall sind beträchtliche Differenzen möglich; unterschiedliche Gewebe einer Pflanze besitzen ebenso wie die Zellwände von Zellkulturen verschiedener Arten abweichende Mengen an Hydroxyprolin (LAMPORT, 1965). Hydroxyprolin kann als gutes Indiz für den Extensin-Gehalt betrachtet werden, da diese Aminosäure einen großen Prozentsatz des Proteins ausmacht. Daneben kommt Hydroxyprolin in größeren Mengen nur in den Arabinogalactan-Proteinen und in Lektinen der Solanaceen vor (FRY, 1983b).

Extensin ist eine relativ gut untersuchte Komponente der Zellwand. Mittlerweile wurde eine cDNA vom Proteinanteil hergestellt und kloniert (CHEN und VARNER, 1985). Präkursor-Moleküle können mit Salzlösungen aus der Zellwand eluiert werden (STUART und VARNER, 1980; SMITH et al., 1984). Diese Moleküle weisen im elektronenmikroskopischen Bild Knicke auf (STAFSTROM und STAEHELIN, 1986a), die mit den von EPSTEIN und LAMPORT (1984) beschriebenen intramolekularen Verknüpfungen von Tyrosin-Molekülen zu Isodityrosin in Verbindung gebracht werden. Isodityrosin (Abb. 1) wurde erstmals von FRY (1982) in der Zellwand entdeckt. Die Diphenyletherbrücke kann auch intermolekular gebildet werden und integriert die Präkursor-Moleküle in das Gerüst der Zellwand; Extensin ist dann nur noch mit $NaClO_2$ extrahierbar. An der Reaktion ist eine Peroxidase beteiligt, die in der Zellwand lokalisiert ist (COOPER und VARNER, 1983b; COOPER und VARNER, 1984).

Der Kohlenhydratanteil hält das Extensin in einer ausgestreckten Konformation; nach Deglycosilierung mit HF sind nur noch 50 % des Moleküls in einer Poly-Prolin-II-Helix (VAN HOLST und VARNER, 1984), wobei sich der Stokes'sche Ra-

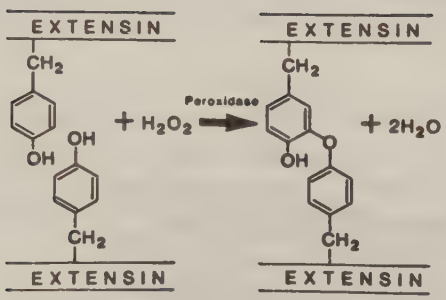


Abb. 1: Intermolekulare Verknüpfung von zwei Molekülen Tyrosin zu Isodityrosin durch eine Peroxidase. Aus: FRY (1985).

dius ändert (STAFSTROM und STAEHELIN, 1986b). Diese Ergebnisse führen zu einem verfeinerten Bild der Architektur der Zellwand.

Die molekulare Struktur wirde noch komplizierter, wenn berücksichtigt wird, daß die Uronsäuren z.T. methyliert sind. Pektine können auch acetyliert sein. Möglicherweise sind Verbindungen zwischen Pektinmolekülen über Diferulat vorhanden (FRY, 1983b), die wie im Falle von Isodityrosein von Peroxidasen geknüpft werden (FRY, 1985).

Bei Algen sind neben Cellulose auch Mannane und Xylane in kristalliner Form beobachtet worden (Übersicht bei PRESTON, 1979; PERCIVAL und MCDOWELL, 1981). Bei *Derbesia marina* besitzt der Gametophyt Cellulose, der Sporophyt Mannan. Insgesamt weisen die Zellwände der Algen vielfältige morphologische und chemische Variationen auf.

Zellwand-Modelle

Umfangreiche Untersuchungen, vor allem im Labor von Albersheim an Zellkulturen von *Acer pseudoplatanus* (Übersicht bei DARVILL et al, 1980; MCNEIL et al., 1984; DEY und BRIN-

SON, 1984), haben zu einem hypothetischen Modell der Architektur der Primärwand geführt (Abb. 2).

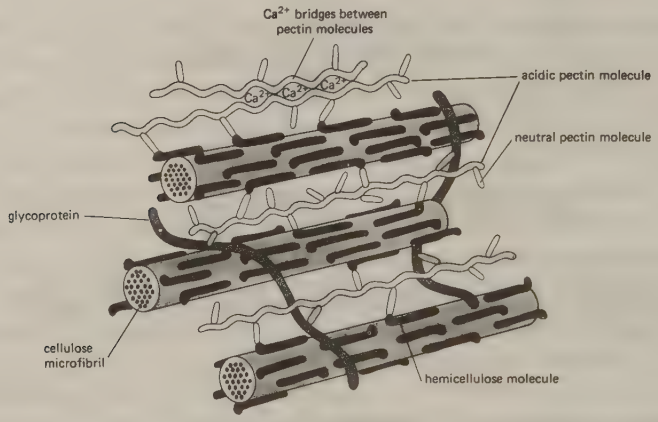


Abb. 2: Modell der Primärwand. Aus: "Molecular Biology of the Cell". ALBERTS/BRAY/LEWIS/ROFF/ROBERTS/WATSON (eds.), Garland Publishing Inc. New York, London, 1983.

Dieses Modell ist aus mehreren Gründen nur als vorläufig zu betrachten:

Zum einen sind die strukturellen Untersuchungen nicht abgeschlossen. Außerdem ist die Verknüpfung der analysierten Bausteine untereinander nicht bekannt. Viele der Ergebnisse wurden an Zellkulturen gewonnen; es ist fraglich, ob die Primärwände intakter Pflanzen in allen Aspekten mit diesem Modell übereinstimmen. So weisen Zellkulturen meistens einen höheren Gehalt an Arabinose in der Zellwand auf als Gewebe intakter Pflanzen. Ein Vergleich zwischen Zellkulturen und Geweben verschiedener Objekte findet sich bei SELVENDRAN (1985).

Unterschiede sind auch zwischen verschiedenen Organen und Geweben einer Pflanze möglich, da die Zellwand den jeweiligen Funktionen angepaßt ist. Denkbar sind auch Unterschiede,

die die Stellung der Art in der Systematik der Pflanzen wiedergeben.

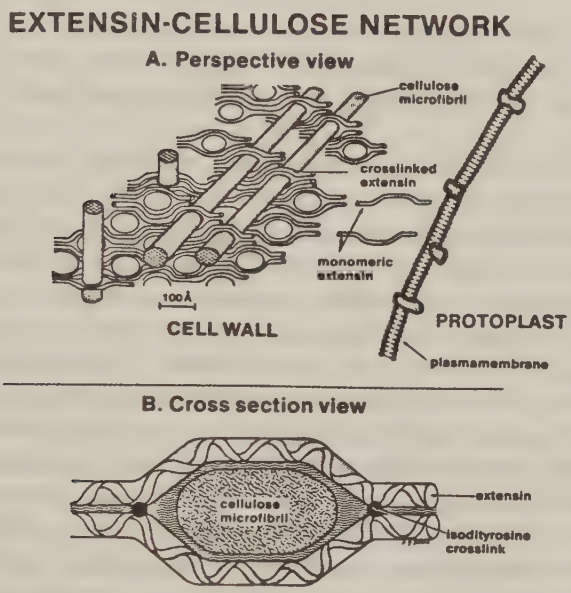


Abb. 3: "warp and weft"-Modell der Anordnung von Cellulose- und Extensinmolekülen in der Primärwand. Aus: LAMPORT und EPSTEIN (1983).

Verfeinerungen des ursprünglichen Modells sind aufgrund der intensiven Erforschung des Extensins vorgeschlagen worden (LAMPORT und EPSTEIN, 1983). Dieses "warp and weft"-Modell ("Kette und Schuß") bringt vor allem Mikrofibrillen und Extensin in einen engeren Zusammenhang (Abb. 3). Dies könnte auch die Rolle des Extensins bei der Kontrolle des Wachstums aufhellen (WILSON und FRY, 1986).
Verbesserte Zellwand-Modelle werden auch von der genaueren Kenntnis der Bindungen zwischen den makromolekularen Bau-

steinen abhängen (FRY, 1986).

Zellwandsynthese

"....it is clear that our ignorance about enzyme interactions in this field greatly exceeds the limited knowledge that has been gleaned so far." (WALDRON und BRETT, 1985)

Eine relativ kleine Anzahl verschiedener Monomere führt durch unterschiedliche Anteile, Bindungstypen, Seitenketten und Modifikationen zu einer Vielzahl komplexer Bausteine der Zellwand. Da die Synthese der Pektine und Hemicellulosen im Golgi-Apparat stattfindet, muß dort eine Koordination von enzymatischen Aktivitäten stattfinden, um einen gezielten Aufbau der Zellwand zu ermöglichen. *In vitro*-Testansätze arbeiten mit einem oder mehreren Nukleotid-Zuckern als Substrat. Da aber z.B. Glucose in mehreren distinkten Polymeren vorkommt, ist die Suche nach nur einem spezifischen Enzym erschwert. Neben möglichst selektiven Testansätzen wird deshalb die Solubilisierung und anschließende Reinigung einzelner Enzyme angestrebt. Bei *Phaseolus aureus* konnten Enzyme solubilisiert werden, die *in vitro* ein Glucomannan synthetisierten (HELLER und VILLEMEZ, 1972a,b). Die Synthese von Glucomannan *in vitro* wurde auch bei Erbsen (BRETT, 1981) und in unserem Labor an Karotten (INGOLD, 1985) beschrieben. In keinem Fall konnten die beteiligten Enzyme zur Homogenität gereinigt werden.
Auch in vielen weiteren Fällen hat sich die Reinigung der an der Synthese der Zellwand beteiligten Enzyme als schwierig erwiesen. Es konnte ebenfalls nicht gezeigt werden, inwieweit die Produkte des *in vitro*-Ansatzes tatsächlichen Bausteinen der Zellwand entsprechen. BOLWELL und NORTHCOTE (1984) wählten deshalb einen anderen Zugang. Sie gewannen monoklonale Antikörper gegen Membranproteine aus Bohnen. Einige der Klone produzierten Antikörper, die in vitro die Aktivität einer Arabinansynthase hemmten und an mehrere Mem-

branproteine banden. Schließlich konnte durch einen Vergleich der Enzymaktivitäten und der Proteinmuster während des Kulturalters ein Polypeptid mit einem MG von 70000 vorläufig als Arabinansynthase identifiziert werden.
Ein besonderes Interesse gilt der Synthese von Cellulose *in vitro*. Es wird allgemein angenommen, daß die Synthese von Cellulose am Plasmalemma stattfindet; dies gilt jedoch nicht für einige Algen wie z.B. *Pleurochrysis scherffelii*, wo im Golgi-Apparat Celluloseschuppen gebildet werden.
Werden Membranen in linearen Gradienten aufgetrennt, so findet sich im Bereich des Plasmalemmas Glucansynthase-Aktivität, die auch als Leitenzym verwendet wird. Das Produkt dieser Glucansynthase II ist jedoch Callose, ein ß-1,3-Glucan (KÖHLE et al., 1985).
Eine Vielzahl früherer Arbeiten, die eine *in vitro*-Synthese von Celluose reklamierten, können aufgrund unzureichender Charakterisierung der Produkte nicht herangezogen werden. So ist die Unlöslichkeit in Alkali kein sicheres Kriterium (DELMER, 1977).
Eine Vielzahl elektronenmikroskopischer Beobachtungen sprechen jedoch für einen Zusammenhang zwischen Partikeln in der Plasmamembran und der Synthese von Cellulose. Bei *Micrasterias* wurden hexagonale Strukturen beobachtet (GIDDINGS et al., 1980); die "Rosetten" genannt wurden. Diese "Rosetten" wurden wurden ebenfalls in höheren Pflanzen (MUELLER und BROWN, 1980), Farnen (WADA und STAEHELIN, 1981) und Moosen (REISS et al., 1984) nachgewiesen. Bei höheren Pflanzen enthalten die "terminalen Komplexe" neben "Rosetten" im "P-face" noch ein "terminal globule" in der "E-face" des Plasmalemmas. Bei Algen gibt es neben "Rosetten" auch lineare Terminalkomplexe, z.B. bei *Oocystis* (Übersicht bei BROWN et al., 1983; MONTEZINOS, 1982; BROWN, 1985). Beide Formen von Terminalkomplexen können bei Algen als Transmembran-Komplexe vorliegen (BROWN et al., 1983).
Folgende Belege sprechen für eine Beteiligung der Terminal-

komplexe an der Synthese von Cellulose:
An diesen Strukturen enden "Eindrücke" von Mikrofibrillen in der Plasmamembran. Zweitens ist bei *Micrasterias* der Beginn der Sekundärwandbildung mit dem Auftreten hexagonal angeordneter Gruppen der "Rosetten" verbunden (GIDDINGS et al., 1980). Bei *Funaria* ist die Zahl der "Rosetten" pro Fläche mit der Wachstumsrate im Apex korreliert (SCHNEPF et al., 1984).
Die Orientierung der gebildeten Mikrofibrillen wird mit Mikrotubuli in Verbindung gebracht. Der genaue Mechanismus der Wechselwirkung ist jedoch unbekannt; es existieren eine Reihe von Hypothesen (Übersichtsartikel von HEATH und SEAGULL, 1982; LLOYD, 1984; BROWN, 1985; LLOYD et al., 1985).
ROBINSON und QUADER (1982) diskutieren Argumente, die für bzw. gegen eine Beteiligung von Mikrotubuli an der Orientierung von Mikrofibrillen sprechen. Ein gutes Indiz ergibt die Anwendung von Substanzen, die die Ausbildung von Mikrotubuli stören. Bei regenerierenden Protoplasten von *Mougeotia* wird die transversale Orientierung der Cellulose-Fibrillen durch Zugabe von Colchicin verhindert (MARCHANT und HINES, 1979). Bei *Zinnia elegans* ändert sich während der Xylogenese die Orientierung der Mikrotubuli von longitudinal nach transversal. Wird diese Änderung durch Zugabe von Taxol unterbunden, ist auch die Richtung der gebildeteten Mikrofibrillen anders: sie liegen jetzt parallel anstatt transversal (FALCONER und SEAGULL, 1985). Im allgemeinen stimmt die Ausrichtung der zuletzt gebildeten Mikrofibrillen mit der der corticalen Mikrotubuli überein (ROBINSON und QUADER, 1982).
Es gibt jedoch Arbeitsgruppen, die die Bedeutung der Mikrotubuli bei der räumlichen Anordnung der Mikrofibrillen geringer einschätzen und bei manchen Systemen andere Modelle vorschlagen (EMONS, 1982; VIAN et al., 1986).
Dieser Vielzahl an elektronenmikroskopischen Befunden steht auf der biochemischen Seite nur die *in vitro*-Synthese

von Cellulose bei dem Bakterium *Acetobacter* gegenüber (ALONI et al., 1982); das Enzym konnte solubilisiert werden (ALONI et al., 1983).

Bei Pflanzen gelangen diese Experimente trotz der Bemühungen vieler Arbeitsgruppen nicht. Möglicherweise werden durch die Homogenisierung der Zellen Komponenten aus dem mutmaßlichen Synthasekomplex entfernt oder die Wechselwirkung mit cytoplasmatischen Faktoren unterbunden (Übersicht bei ROBINSON und QUADER, 1981); eventuell ist ein bestimmtes Membranpotential notwendig (BACIC und DELMER, 1981). Auch die Beteiligung von Lipid- und Protein-Zwischenstufen an der Synthese wird diskutiert; HOPP et al. (1978) erarbeiteten an der Grünalge *Prototheka zopfii* ein Modell für die Beteiligung dieser Zwischenprodukte . QUADER und HERTH (1986) fanden jedoch bei diesem Organismus weder "Rosetten" noch lineare Terminalkomplexe; die Zellwand scheint ebenfalls keine kristalline Cellulose I zu besitzen. Diese Autoren sehen deshalb die an Lipide gebundene Glucose im Zusammenhang mit der Synthese von Glucopeptiden der Zellwand.

Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten wird deshalb versucht, die Proteine, die an der Synthese von Cellulose beteiligt sind, indirekt zu identifizieren (DELMER et al., 1985). Von DCB, einem spezifischen Hemmstoff der Cellulose-Synthese *in vivo*, wurde ein Analogon synthetisiert, das nach Aktivierung mit UV eine irreversible Bindung mit Protein bildet. Gibt man dieses Analogon zu Zellkulturen, wird die Cellulose-Synthese ebenfalls gehemmt, es bindet also vermutlich an dasselbe Protein wie DCB. Nachdem durch Bestrahlung mit UV die Bindung irreversibel gemacht wird, ergibt sich die Möglichkeit, das Protein zu isolieren, Antikörper herzustellen, diese zu markieren und die Terminalkomplexe auf ihre Funktion als mutmaßliche Cellulose-Synthase zu überprüfen.

Die Schwierigkeiten, die mit der *in vitro*-Synthese von Glucanen verbunden sein können, werden von Frau Delmer ironisch beschrieben:

"....in our former laboratory in Michigan, we also observed some limited production of ß-(1,4)-glucan *in vitro* using cotton fibre extracts prepared in PEG-4000 (...), but were not able to reproduce this result in California." (zitiert nach DELMER et al., 1985; bereits geäußert auf dem Zellwand-Kongreß 1983 in Fribourg, Schweiz).

Regulation der Synthese und Modifikationen der Zellwand

Der Aufbau der Zellwand spiegelt in der Struktur und biochemischen Zusammensetzung die Erfordernisse der jeweiligen Zelle oder Gewebes aufgrund bestimmter Aufgaben wider. Die Struktur kann sich mit dem Alter und Differenzierungsgrad der Zelle ändern. Äußere Faktoren können zu Modifikationen der bestehenden Zellwand führen. Die Zelle wird daher auf verschiedenen Ebenen regulierend eingreifen können, über die Änderung von Transkriptions- und Translationsaktivitäten, die Bereitstellung von Substraten oder Effektoren zur Regulierung von Enzymaktivitäten. Die Mechanismen sind im Detail unbekannt.

Die geotropische Reaktion der Haferkoleoptile ist durch eine Änderung der Orientierung von Mikrofibrillen in der unteren Hälfte des Gewebes gekennzeichnet; die Mikrofibrillen sind im oberen Halbzylinder weiterhin transversal zur Längsachse orientiert, im unteren Halbzylinder 12 min nach der Reizung mehr zufällig verteilt (BROWN, 1985). Die Zahl der Terminalkomplexe in der unteren Hälfte des Gewebes ist im Vergleich zu Kontrollpflanzen stark reduziert. Die Reorientierung der Mikrofibrillen konnte durch Gabe exogenen Auxins nicht innerhalb dieser Zeit erzielt werden.

Die Rolle von Phytohormonen ist jedoch in vielen Systemen belegt. Ein Paradebeispiel ist das Streckungswachstum vieler Gewebe, insbesonders von Koleoptilen. Auxin führt zu einer Ansäuerung der Zellwand, die eine Erhöhung der Dehnbarkeit zur Folge hat (HAGER et al., 1971; CLELAND, 1973). Wird die Ansäuerung durch Puffer verhindert, ist die Streckung

gehemmt; mit sauren Puffern allein wird säureinduziertes Wachstum ausgelöst. Protonen wirken hier also als "wall loosening factor" (CLELAND, 1986). Die Ansäuerung nach Zugabe von Auxin wird nach den Vorstellungen von HAGER et al. (1971) durch eine ATPase bewirkt. Mit Vanadat, einem Hemmstoff der an der Plasmamembran lokalisierten ATPase, wird bei Hypokotylsegmenten von *Cucumis sativus* die Ansäuerung und das Auxin-induzierte Wachstum unterbunden (BRUMMELL, 1986).

Welche Bausteine der Wand bei der Erhöhung der Dehnbarkeit beteiligt sind, ist noch umstritten.

Bei Erbsen werden nach kurzer Zeit Xyloglucane in geringer Menge freigesetzt (LABAVITCH und RAY, 1974). Bei anderen Objekten ändern sich die durchschnittlichen Molekulargewichte von Xyloglucanen (NISHITANI und MASUDA (1982; 1983). Dies konnte auch bei Koleoptilen von *Avena* bestätigt werden (INOUHE et al., 1984). Dafür sind möglicherweise Glucanasen verantwortlich (Übersichtsartikel von TAIZ, 1984). HAYASHI et al. (1984) konnten bei Erbsen die Induktion von Endo-1,4-ß-Glucanase durch Auxin feststellen.

Protonen sind jedoch nicht in jedem System der "wall loosening factor" (CLELAND, 1986). Auch wenn die Konzentration von Calcium in der Zellwand erniedrigt wird, kann sich die Dehnbarkeit der Wand erhöhen. Calcium bildet Brücken zwischen Polygalacturonsäure-haltigen Bausteinen. Durch Ansäuern wird die Bindungskapazität für Calcium bei Epikotylen von Erbsen erniedrigt (BAYDOUN und BRETT, 1984). KONNO et al. (1984) konnten bei Wurzeln von *Cucumis sativus* zeigen, daß ein Calcium-Mangelmedium zu einer Änderung der Pektinfraktion führt; die Aktivität einer Polygalacturonase war erhöht.

Für ein kontinuierliches Wachstum nach Zugabe von Auxin muß neben der unmittelbaren Änderung der Dehnbarkeit auch für eine Neusynthese von Zellwandmaterial gesorgt werden. Bei Mais (WALTON und RAY, 1982) und Erbsen (RAY, 1985) wird durch Auxin die Aktivität der Glucansynthase kontrolliert.

Bei *Solanum tuberosum* wurde eine Erhöhung der Synthese von Extensin bei Auxin-induziertem Wachstum gefunden (SHANNON et al., 1984). Allgemein scheint eine Neusynthese aller Zellwandkomponenten bei Auxin-induziertem Wachstum vorzuliegen (TAIZ, 1984).
Außer Auxin können auch andere Phytohormone zu einer Änderung der Dehnbarkeit der Zellwand führen (CLELAND, 1986). Weiterhin kann Ethylen die Orientierung der Mikrofibrillen beeinflußen (LANG et al., 1982). Ethylen spielt auch, neben anderen Phytohormonen, eine Rolle bei der Fruchtreife (Übersicht bei DEY und BRINSON, 1984). Bei der Fruchtreife kann sich die Zellwand hinsichtlich der Zusammensetzung aus neutralen Zuckern ändern (GROSS und SAMS, 1984). Bei Papaya wurden Zellwand-abbauende Enzyme nachgewiesen (PAULL und CHEN, 1983).
Modifikationen der Zellwand werden auch während des Kulturalters von Zellkulturen beobachtet (AMINO und KOMAMINE, 1985).
Bei der Differenzierung von Kambiumzellen zu Xylem von *Acer pseudoplatanus* nimmt die Aktivität der Xylansynthase zu (DALESSANDRO und NORTHCOTE, 1981), während die der Polygalacturonsäure-Synthase abnimmt (BOLWELL et al., 1985a).
Bei der Entwicklung von Baumwollhaaren lassen sich ß-Glucanasen nachweisen (BUCHELI et al., 1985). Ihre Funktion ist nicht klar; möglicherweise stehen sie mit einem "turnover" von Callose in Zusammenhang.

Problemstellung

Die pflanzliche Zellwand ist ein biochemisch sehr vielfältiges Gerüst aus Polysacchariden und Glycoproteinen. Dies erschwert die Charakterisierung der an der Synthese beteiligten Enzyme. Um ein einheitliches Ausgangsmaterial zu haben, werden deshalb viele Untersuchungen nicht an ganzen Pflanzen, sondern an speziellen Gewebetypen oder Zellkulturen durchgeführt. Besonders Protoplasten sind ein reiz-

volles Spezialsystem, da hier eine *de novo*-Synthese der Zellwand vorliegt. Bereits 1887 konnte TOWNSEND zeigen, daß plasmolysierte Zellen von *Elodea* und *Gaillardia* fähig sind, eine Zellwand zu regenerieren. Dieser Prozeß wurde häufig elektronenmikroskopisch untersucht (Übersichtsartikel von WILLISON und KLEIN, 1982; BURGESS, 1983; SEITZ et al., 1986).

Es gibt jedoch vergleichsweise wenig biochemische Untersuchungen; die Wand scheint jedoch anders als beim Ausgangsmaterial zu sein (BLASCHEK et al., 1981). Dies ist allerdings nicht als Nachteil zu werten, da an solchen Spezialsystemen die Zuordnung der Produkte von *in vitro* gemessenen Synthase-Aktivitäten zu tatsächlich in der Zellwand auftretenden Bausteinen unter Umständen erleichtert ist. Solche enzymatischen Aktivitäten wurden von LANGE-BARTELS et al. (1981) in unserem Labor im Verlauf der Regeneration von Protoplasten verfolgt. Die Enzyme wurden mittlerweile an Zellkulturen von *Daucus* näher charakterisiert (INGOLD und SEITZ, 1986).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Zellwand und die ins Medium abgegebenen Komponenten von Zellkulturen und regenerierenden Protoplasten einer Zellinie von *Daucus carota* biochemisch näher zu untersuchen.

Um die Enzyme, die an der Synthese der Zellwand beteiligt sind, besser charakterisieren zu können, wird eine Solubilisierung und Reinigung angestrebt. Da die weitere Reinigung der Enzyme aus Rohhomogenaten sich in vielen Fällen als schwierig erwiesen hat, ist eine möglichst angereicherte, spezifische Präparation wünschenswert. Dies bedeutet, daß die Membranen des Golgi-Apparates bzw. des Plasmalemmas sauber vorliegen müssen. Ein zweites Ziel dieser Arbeit war deshalb, Verfahren zur Trennung von Membranen zu erproben. Neben linearen Gradienten sollte eine neu entwickelte Methodik geprüft werden, die eine verbesserte Trennung von Membranen bei Protoplasten in kurzer Zeit ermöglichen soll. Diese Methode wurde von CHANEY und JACOBSON (1983) bzw.

SCHMIDT et al. (1983) entwickelt. Sie beruht auf folgendem Prinzip: Positiv geladene "microbeads" werden an das Plasmalemma der Protoplasten gebunden und quervernetzt. Aufgrund der hohen Dichte der "microbeads" ist nach der Lyse der Protoplasten eine rasche und saubere Abtrennung der Plasmamembran durch einfache Zentrifugation möglich. Da die "microbeads" untereinander vernetzt sind, entstehen bei der Lyse "sheets" (CHANEY und JACOBSON, 1983).
Es sollte geprüft werden, ob sich diese Technik bei Protoplasten der Karotte anwenden läßt. Einmal, um eine angereicherte Fraktion der Plasmamembran zu erhalten; andererseits, um die restlichen Membranen der Zelle, insbesondere diejenigen des Golgi-Apparates, ohne Kontamination durch das Plasmalemma auftrennen zu können.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsobjekt

Als Versuchsmaterial diente eine Suspensionskultur von *Daucus carota* ssp. *sativa*. Aus der anthocyanhaltigen Wurzel wurde 1966 eine Kalluskultur angelegt (ALFERMANN und REINHARD, 1971). Die Kultivierung der Kalluskultur erfolgte zunächst auf dem Medium nach BLAKELY und STEWARD (1964) mit 10^{-6} M 2,4-D, ab 1967 auf dem I,2a-Agar-Medium nach SEITZ und RICHTER (1970) bei 26 °C im Dauerdunkel. Aus der anthocyanhaltigen Zellinie wurde durch Überführen in flüssiges I,2a-Medium (SEITZ et al., 1985) eine Suspensionskultur angelegt.
Die Kultivierung erfolgte in 250 ml - Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Pilot Shake, Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz) mit 110 Upm bei 26 °C im Dauerdunkel. Im wöchentlichen Rhythmus wurden 10 ml der Kultur in frisches Medium steril überimpft (clean bench, Laminar air flow class 100, Gelman Instrument).
Am Beginn der Experimente war die als DC_{b1} bezeichnete Zellinie 180 Passagen alt, zeigte keinerlei Akkumulation an Anthocyanen mehr und war durch ein schnelles Teilungswachstum gekennzeichnet.

2. Isolierung von Protoplasten

Die Isolierung der Protoplasten erfolgte nach LANGEBARTELS (1981). Fünf Tage alte Suspensionszellen wurden über Miracloth filtriert; je 5 g wurden mit einem Spatel in 50 ml Isolierungsmedium überführt. Bei Langzeitisolierungen bestand dieses aus 1,8 % (w/v) Cellulase Onozuka R10 in PI-3; die Inkubation erfolgte über 18 h bei 22±1 °C. Bei Kurzzeitisolierungen setzte sich das Medium aus 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka R10 und 0,2 % (w/v) Rhozyme HP-150 in PI-3 zusammen; die Inkubation erfolgte über 5 h bei 29±1 °C. In

beiden Fällen wurde der pH des Inkubationsmediums mit KOH auf 5,6 eingestellt; die Inkubation erfolgte auf einem Inkubationsschüttler (New Brunswick, New York) bei 80 Upm im Dauerdunkel. In der Regel wurden Langzeitisolierungen durchgeführt, bei Kurzzeitisolierung erfolgt eine Angabe beim jeweiligen Experiment.
Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Protoplastensuspensionen durch Nylonnetze von 100 und 60 µm Porenweite filtriert. Wenn die Protoplasten anschließend kultiviert wurden, geschah diese Filtration einleitend mit einem 140 µm-Netz; bei großen Mengen an Ausgangsmaterial (25 g Zellen) erfolgte die Filtration über zwei 60 µm-Netze, um ein Verstopfen der Maschen zu vermeiden.
Nach der Filtration wurde die Protoplastensuspension bei 100 g 5 min abzentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ, Osterode), der Überstand mit einer Spritze abgenommen. Die sedimentierten Protoplasten wurden in PI-3 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, um die zellwandabbauenden Enzyme vollständig zu entfernen.
Sollten die Protoplasten anschließend kultiviert werden, geschahen alle Schritte unter sterilen Bedingungen. Die Enzymlösungen wurden in diesen Fällen zweimal mit Sterilfiltergeräten (Sartorius, Göttingen) filtriert, alle benötigten Arbeitsgeräte wurden autoklaviert.

3. Kultur von Protoplasten

Nach der letzten Zentrifugation (2.) wurden die Protoplasten im Kulturmedium PC-6 (LANGEBARTELS, 1981) resuspendiert und mit einer abgesägten Pipette je 10 ml auf Petrischalen (9 cm Durchmesser) verteilt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen; die Kultivierung erfolgte bei 23±1 °C im Dauerdunkel. Die Dichte der Protoplastensuspension betrug $1-3*10^5$ Protoplasten je ml Medium. In einem Fall wurden Protoplasten in Gegenwart von DMSO regeneriert; DMSO wurde

sterilfiltriert (SM 16534K, 0,2 µm Porenweite, Sartorius, Göttingen) und dem Medium PC-6 zugesetzt.

4. Bestimmung der Vitalität und Beobachtung der Zellwandregeneration bei Protoplasten

4.1. Vitalitätstest mit Phenosafranin nach FERRARI et al. (1975)

Zu 200 µl Phenosafraninlösung (0,1 % in PI-3) wurden mit einer Eppendorfpipette (abgeschnittene blaue Spitze) 200 µl Protoplastensuspension gegeben.
Die Protoplasten wurden dann in einer Zählkammer (Neubauer, 0.0625 mm² * 0,2 mm) begutachtet und der Prozentsatz an rot gefärbten, d.h. nicht vitalen Protoplasten bestimmt.

4.2. Beobachtung der Zellwandregeneration mit Calcofluor White ST

200 µl Protoplastensuspension wurden mit einem gleichen Volumen Calcofluor White-Lösung (0,1 % in PI-3) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt. Nach 5 min wurde abzentrifugiert (5 min, 100 g) und das Sediment in PI-3 resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen Objektträger gebracht und mit einem mit Plastilin-"Füßchen" versehenen Deckgläschen abgedeckt. Die regenerierenden Protoplasten wurden dann mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss; Erregerfilter IV und Sperrfilter 65/41) auf bläulich fluoreszierende Zellwände untersucht.

4.3. Beobachtung der Zellwandregeneration mit SDS-Phenosafraninlösung

Gleiche Volumina an 1 % SDS in Phenosafraninlösung (0,1 % in PI-3) und Protoplastensuspension wurden gemischt und in einer Zählkammer (Neubauer) unter dem Mikroskop beobachtet.

Bei vollständigem Abbau der Zellwand platzen die Protoplasten. Hatten die Protoplasten eine Zellwand regeneriert, blieb nach Auflösung der Membranstrukturen ein intensiv rot gefärbter Zellwand-"ghost" zurück.

5. Zellzahlbestimmung bei Protoplasten

Die Zellzahlbestimmung erfolgte entweder zusammen mit dem Vitalitätstest (4.1.) oder durch direktes Aufbringen der Protoplastensuspension auf die Zählkammer (Neubauer) nach geeigneter Verdünnung mit PI-3. Mittelwerte wurden aus 3-4 Parallelproben ermittelt.

6. Zellzahlbestimmung und weitere Parameter zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Suspensionzellen

6.1. Zellzahlbestimmung bei Suspensionszellen

Aliquots von 1 ml Zellsuspension wurden mit einer abgesägten Pipette entnommen und mit 1 ml Chromsäure (4,5 g Chrom-VI-oxid in 25,5 ml H_2O) versetzt. Die Proben wurden 20 min bei 60 °C inkubiert und dabei in den ersten und letzten 5 min in Pasteurpipetten auf- und abbewegt, um Zellklumpen aufzulösen. Nach Zugabe von 4-6 ml NaCl (1 %) wurden die Proben in einer Zählkammer (Neubauer, 0,0625 mm^2 * 0,2 mm) ausgezählt. Je Ansatz wurde ein Mittelwert aus 2-3 Proben herangezogen.

6.2. Frischgewicht

Zur Bestimmung des Frischgewichtes wurden 5 ml Zellsuspension mit einer Wasserstrahlpumpe über Glasfaserfilter (SM 13400, Sartorius, Göttingen) abgesaugt und gewogen. Bei jedem Ansatz erfolgten 3 parallele Messungen.

6.3. Trockengewicht

Nach der Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Proben 72 h gefriergetrocknet (Heraeus Christ, Osterode) und erneut gewogen.

6.4. Gepacktes Zellvolumen ("PCV")

Die Bestimmung des "packed cell volume" erfolgte durch Zentrifugation von 1 ml Zellsuspension in modifizierten Hämatokrit-Röhrchen (SEITZ et al., 1985). Die Proben wurden 5 min lang bei 3400 Upm abzentrifugiert (Tischzentrifuge Phywe 3/6). Pro Ansatz wurden 4 parallele Werte ermittelt.

7. Isolierung der Zellwand von Suspensionszellen oder regenerierenden Protoplasten

Von der Suspensionskultur wurde das Volumen bestimmt und Aliquots zur Zellzahlbestimmung entnommen. Suspensionszellen wurden mit einer Wasserstrahlpumpe auf einem Büchnertrichter trockengesaugt und das Frischgewicht bestimmt. Die Zellen wurden entweder sofort aufgeschlossen oder mit flüssigem Stickstoff gefroren und bis zum Aufschluß bei -18 °C aufbewahrt.

Regenerierende Protoplasten wurden durch Zentrifugation (100 g, 5 min) vom Kulturmedium getrennt, der Überstand mit einer Spritze abgenommen. Überstand und Sediment (im Zentrifugenbecher) wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -18 °C aufbewahrt.

Der Aufschluß erfolgte nach Zugabe von Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.2, 4 °C) durch Ultraschall-Behandlung (Sonifier Ultraschall Desintegrator, Branson, Heusenstamm, mit Mikrospitze, Stufe 5) für 2mal 30 sec mit 30 sec Pause; die Proben befanden sich dabei in Zentrifugenbechern und wurden eisgekühlt.

Das Verhältnis Puffer (in ml) zu Frischgewicht (in Gramm)

betrug bei Suspensionszellen mindestens 3:1, in der Regel jedoch 6:1; bei Protoplasten wurde nie mehr als 1 ml Volumen an sedimentierten Protoplasten auf 3 ml Puffer verwendet.
Nach dem Aufschluß wurde das Homogenat mit Ethanol (96 %, vergällt) auf eine 70 %ige Ethanolkonzentration (v/v) gebracht, dann bei 4 °C 10 min bei 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritze vorsichtig abgenommen und das Sediment in 3 ml H_2O (Zimmertemperatur) resuspendiert (Labor Mix); dabei war bei einzelnen Proben eine erneute Behandlung mit Ultraschall erforderlich. Wenn dies der Fall war, wurden die anderen Proben der betreffenden Aufarbeitung auf gleiche Art behandelt. Danach erfolgte wieder die Zugabe von Ethanol auf 70 % (v/v) und erneute Zentrifugation (10 min, 6000 g). Diese Waschprozedur mit 70 % EtOH wurde 2mal wiederholt, das letzte Sediment in gleichen Volumina an Puffer und Azidlösung (0,02 %) resuspendiert, das Gesamtvolumen entsprach dem oben aufgeführten Verhältnis. Dann wurden 30 - 60 Units α-Amylase je Ansatz (0,5-1 g Frischgewicht Suspensionszellen oder bis zu $3*10^7$ Protoplasten) zugegeben. Die Inkubation zum Abbau der Stärke erfolgte bei 26 °C auf einem Rundschüttler (110 Upm) bei verschiedenen Zeiten:
a) bei Zellwänden aus Suspensionszellen 18 h
b) bei Zellwänden von regenerierenden Protoplasten 1 h
Nach der Inkubation mit α-Amylase wurde die Suspension wieder auf 70 % (v/v) Ethanol gebracht und zentrifugiert (10 min, 6000 g). Anschließend wurde die oben beschriebene Waschprozedur noch dreimal durchgeführt. Das letzte Sediment wurde mit einem Glas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Braun, Melsungen) in 2-5 ml H_2O bidest. resuspendiert; dabei wurde zum Überführen der Proben eine mechanische Pipette mit abgesägter Spitze verwendet.
Eine Begründung der zur Isolierung der Zellwand angewendeten Methodik erfolgt unter Ziffer III.3.2.

8. Isolierung der extrazellulären Polysaccharide (ECP) und Glycoproteine aus dem Kulturfiltrat von Suspensionszellen oder dem Medium regenerierender Protoplasten

Das beim Abfiltrieren der Suspensionszellen oder Abzentrifugieren der regenerierenden Protoplasten anfallende Medium wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -18 °C gelagert.
Als erster Schritt erfolgte eine Dialyse (24 h, Visking Dialyseschläuche, Serva, Heidelberg) gegen destilliertes Wasser bei 4 °C unter ständigem Rühren mit mindestens dreimaligem Wasserwechsel.
Die Proben wurden dann im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 30 °C auf etwa 1 ml eingeengt, dann in einen Zentrifugenbecher überführt und unter Nachspülen des Kolbens auf 3 ml H_2O ergänzt. Anschließend wurde Ethanol auf 70 % (v/v) zugegeben und zentrifugiert (10 min, 6000 g). Es erfolgten drei weitere Reinigungsschritte mit 70 % Ethanol wie unter 7. beschrieben. Das letzte Sediment wurde in gleicher Weise in 2-5 ml bidestilliertem H_2O resuspendiert.

9. Untersuchung der isolierten Zellwände und extrazellulären Komponenten

Bemerkung: bei allen Tests mit suspendiertem Zellwandmaterial oder extrazellulären Polysacchariden müssen die Proben unmittelbar vor dem Pipettieren gut geschüttelt werden.

9.1. Phenol-Schwefelsäure-Test (DUBOIS et al., 1956)

Dieser Test dient zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes einer Probe. Geeignete Volumina an suspendierter Probe (meist 10-100 µl) wurden mit H_2O jeweils auf 1 ml ergänzt, dann wurden 25 µl Phenollösung (80 %, w/w) zugegeben und gemischt. Dann wurden mit einer Pipettierhilfe rasch jeweils 2,5 ml H_2SO_4 conc. zugegeben und die Proben sofort

gemischt. Nach 20-30 min wurde die Extinktion im Spektralphotometer bei 490 nm vermessen (Typ 250, Gilford, Oberlin, USA). Als Standard wurde Glucose verwendet.
Galacturonsäure ergibt in diesem Test nur ein Drittel der Extinktion einer gleichen Menge an Glucose. Zur exakten Berechnung der Menge an Gesamtkohlenhydrat wurden deshalb noch zwei Drittel der Menge an Uronsäuren (Bestimmung nach 9.2.) hinzugezählt.

9.2. Hydroxybiphenylmethode zur Bestimmung von Uronsäuren nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973)

Reagenz a): 12,5 mM Natriumtetraborat in H_2SO_4 conc.
Reagenz b): 0,15 % (w/v) Hydroxybiphenyl in 0,5 % (w/v) NaOH
Die Proben wurden (falls nötig) mit H_2O auf ein Testvolumen von 300 µl ergänzt, dann in einem Eisbad gekühlt. Anschließend wurden vorsichtig 1,8 ml Reagenz a) zugegeben. Nach Schütteln wurden die Proben 5 min bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 20 µl NaOH (0,5 %; w/v) zugegeben und die Extinktion bei 520 nm (Gilford, Typ 250) vermessen. Dann wurden 20 µl Reagenz b) zugegeben, geschüttelt und nach frühestens 5 min erneut die Extinktion bei 520 nm bestimmt. Aus der Differenz der Meßwerte konnte über eine Eichkurve mit Galacturonsäure als Standard die Menge an Uronsäuren ermittelt werden. Reagenz a) wurde immer frisch angesetzt, da bei älterem Reagenz die Entwicklung des Farbkomplexes bis zu einer Stunde benötigen kann.

9.3. Bestimmung von Cellulose nach UPDEGRAFF (1969)

Reagenz a): 80 % (v/v) Essigsäure und Salpetersäure conc. im Verhältnis 10+1; frisch angesetzt
Reagenz b): 1mg/ml Anthron in 75 % (v/v) H_2SO_4
100-200 µl Probe wurden mit 3 ml Reagenz a) 30 min gekocht (Reagenzgläser mit Glasmurmeln). Dann wurde 10 min bei 6000 g zentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ) und das Se-

diment 2mal mit H_2O gewaschen. Das letzte Sediment wurde in 2 ml Reagenz b) resuspendiert und erneut 16 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion bei 620 nm vermessen (Gilford, Typ 250). Zur Quantifizierung diente eine Eichkurve mit α-Cellulose.

9.4. Bestimmung von Hydroxyprolin nach DRODZD et al. (1976) bzw. WIENECKE et al. (1982)

Reagenzien:
Acetat-Citrat-Puffer: 5,7 g Natriumacetat und 3,75 g Natriumcitrat wurden in 20 ml Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 38,5 ml Isopropanol wurde der pH mit Essigsäure auf 6 eingestellt und das Volumen mit Wasser auf 100 ml ergänzt.
Chloramin T-Lösung: 10 % (w/v) in H_2O
Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung: 5 % (w/v) p-Dimethylaminobenzaldehyd in Isopropanol. Diese Lösung wurde immer frisch angesetzt.

- Gleiche Volumina an Probe und conc. HCl wurden in Reaktionsgefäßen (Macherey und Nagel, Düren) 3 h bei 120 °C oder 15 h bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert.
- Das Hydrolysat wurde nötigenfalls filtriert, dann im Rotationsverdampfer bei 50 °C zur Trockene eingeengt.
- Der Rückstand wurde mit 4*100 µl H_2O in ein Reagenzglas überführt. Nach Zugabe von 5 µl Phenolphthaleinlösung (0,1 % w/v in Ethanol) wurde mit Natronlauge neutralisiert und nach dem Farbumschlag das Volumen mit H_2O auf 0,5 ml ergänzt.
- Zu allen Proben wurden 200 µl Acetat-Citrat-Puffer und 100 µl Chloramin T-Lösung gegeben, dann wurden die Proben gemischt und 10 min bei 30 °C inkubiert.
- Nach Zugabe von 100 µl Perchlorsäure (72 %) und 0,5 ml Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung wurde wieder gemischt und dann 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 560 nm bestimmt (Gilford, Typ 250).

- Zur Ermittlung der Eigenabsorption der Proben wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen statt der Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung nur Isopropanol zugegeben wurde.
Mit Hydroxyprolin wurde eine Eichkurve erstellt.

9.5. Gaschromatographische Analyse der Polysaccharide: Bestimmung der Monosaccharide als Alditol-Acetate nach HARRIS et al. (1984) und EMMERLING (1986)

9.5.1. Aufarbeitung

Zellwand-Proben wurden vorab mit Chloroform/Methanol (1:1; v/v) und 0,1 % SDS gewaschen und jeweils durch Zentrifugation (10000 g, 10 min) wieder sedimentiert. Das letzte Sediment wurde in H_2O resuspendiert.
Zur Hydrolyse wurden die Proben in Reaktionsgefäße (Macherey und Nagel, Düren) gegeben und als interner Standard eine geeignete Menge an Inosit zugesetzt. Dann wurde ein gleiches Volumen an 4 M TFA hinzupipettiert, damit eine Endkonzentration von 2 M TFA vorlag. Die Proben wurden dann 1 h bei 120 °C im Trockenschrank inkubiert und anschließend durch Abblasen mit gefilterter Luft eingeengt. Die Hydrolyse der Cellulose-Fraktion der fraktionierten Zellwände erfolgte mit H_2SO_4 und ist bei EMMERLING (1986) beschrieben.
Die Reduktion erfolgte mit 1 ml einer frisch hergestellten Lösung von 0,5 M $NaBH_4$ in 2 M NH_3 bei 60 °C (1 h). Nach Zugabe von 0,5 ml Aceton wurden die Proben erneut eingeengt.
Zur Acetylierung wurde der Rückstand in 200 µl Eisessig gelöst; dann wurden 1 ml Ethylacetat, 4 ml Acetanhydrid und 100 µl Perchlorsäure (70 %) hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Proben in Reagenzgläser überführt und auf Eis gekühlt. Dann wurden 8 ml H_2O langsam zugegeben, dabei wurden die Reaktionsgefäße nachgespült. Schließlich wurden die Proben mit je 200 µl 1-Methylimidazol versetzt, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit 750 µl Dichlormethan extrahiert, die CH_2Cl_2-Phasen anschlie-

ßend zweimal mit 1,5 ml H_2O gewaschen. Die Dichlormethan-Phasen wurden dann konzentriert und bis zum Einspritzen in den Gaschromatographen bei −18 °C aufbewahrt.

9.5.2. Gaschromatographische Bedingungen

Für die Auftrennung der Alditolacetate stand ein Packard GC 427 Gaschromatograph zur Verfügung. Es wurde eine Glassäule (180 cm*2 mm i.d.) benutzt, die mit 3 % SP2340 auf 100/120 Supelcoport (Supelco, Bellefonte) gepackt war. Das Temperaturprogramm verlief mit 3 °C/min von 190 °C bis 250 °C. Der Flammen-Ionisationsdetektor wurde mit H_2 (1 bar) und synthetischer Luft (0,8 bar) gespeist, die Temperatur des Injektors betrug 275 °C. Als Trägergas diente Helium mit einer Flußrate von 50 ml/min.
Bei einem Lauf wurden mit einer 5-µl-Spritze (Hamilton) etwa 1 µl eingespritzt, das Signal des Detektors kontinuierlich mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

9.5.3. Identifizierung der Alditolacetate

Die Alditolacetate wurden anhand der relativen Retentionszeit bekannter Standards bezüglich des Inositol-Hexaacetats identifiziert.

9.5.4. Quantifizierung der Alditolacetate

Zur Quantifizierung wurde parallel zu den Proben ein Gemisch mit gleichen Mengen bekannter Zucker aufgearbeitet. Damit ergab sich für jedes Monosaccharid ein RRF-Wert (RRF : relative response factor) in Bezug auf Inosit. Die Auswertung erfolgte durch Auswiegen der "peak"-Flächen. Die Werte einzelner Flächen einer Probe wurden durch die entsprechenden RRF-Werte dividiert und anschließend summiert. Die Anteile der einzelnen Zucker konnten dann in Gewichtsprozenten angegeben werden.

9.6. Fraktionierung der Zellwand- und extrazellulärer Polysaccharide

Pektin-Fraktion:
Die Proben wurden zunächst 4 h in 50 mM EDTA/50 mM Natriumacetat Puffer (pH 4,5) gekocht. Das Volumen des Puffers (in ml) war etwa zehnfach im Vergleich zum Kohlenhydratmaterial (in mg).
Nach Zentrifugation (10000 g, 10 min) wurde das Sediment mit H_2O gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden 24 h dialysiert (Dialysierschlauch Visking, Serva, Heidelberg) , im Rotationsverdampfer bei 30 °C auf ein kleines Volumen eingeengt und in ein Homogenisationsgefäß (Potter-Elvehjem, Braun, Melsungen) überführt. Der Kolben wurde mehrfach mit Wasser nachgespült und die Proben schließlich auf ein gewünschtes Volumen eingestellt. Die Proben wurden dann homogenisiert, in Eppendorfgefäße überführt und bis zu den Messungen bei -18 °C aufbewahrt. Diese Proben entsprachen der Pektin-Fraktion.
Hemicellulose-Fraktion:
Das Sediment wurde in einer Lösung von 10 mM $NaBH_4$ in 24 % KOH (w/v) resuspendiert und unter Stickstoff 24 h bei 26 °C auf einem Rundschüttler (110 Upm) inkubiert. Danach wurde wieder zentrifugiert (10 min, 10000 g) und je einmal mit 12 % (w/v) KOH bzw. H_2O gewaschen. Die Überstände wurden mit Eisessig neutralisiert, wie oben beschrieben dialysiert, eingeengt, auf ein bestimmtes Volumen eingestellt und homogenisiert. Diese Proben entsprachen der Hemicellulose-Fraktion.
Cellulose-Fraktion:
Die letzten Sedimente wurden in H_2O resuspendiert, homogenisiert und wie beschrieben aufbewahrt. Diese Proben wurden als Cellulose-Fraktion bezeichnet.

9.7. Versuche mit einem Yariv-Reagenz und Extraktion von Extensin aus der Zellwand

9.7.1. Synthese des ß-Galactosyl-Yariv-Reagenzes nach YARIV et al. (1962)

Yariv-Reagenzien sind künstliche Kohlenhydrat-Antigene; sie bestehen aus 4-Aminophenylglycosiden, die über eine Diazoverbindung mit Phloroglucinol verbunden sind. Sie wurden ursprünglich hergestellt, um Antikörper gegen Glycoside zu entdecken. Zufällig wurde aber bemerkt, daß sie die Fähigkeit haben, Arabinogalactan-Proteine zu präzipitieren. Die Struktur des ß-Galactosyl-Yariv-Reagenzes (1,3,5-Tri-(4-ß-D-galactopyranosyl-oxyphenylazo)2,4,6-trihydroxybenzol) zeigt folgende Abbildung:

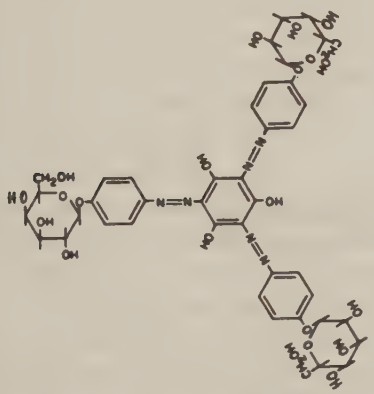
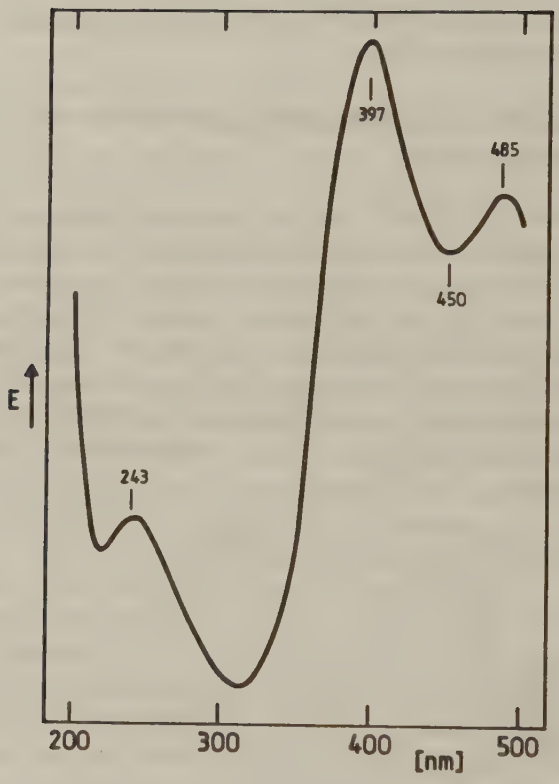


Abb. 4: Struktur des ß-Galactosyl-Yariv-Reagenzes.

Die Synthese wurde auf folgende Weise durchgeführt:
40 µMol p-Aminophenyl-ß-D-Galactopyranosid wurden in 250 µl HCl (0,5 N) gelöst. Die Diazotierung erfolgte durch schrittweise Zugabe von 40 µMol $NaNO_2$ in 100 µl H_2O innnerhalb von 2 h bei 0 °C. Anschließend wurden 10 µMol Phloroglucinol in 500 µl H_2O zugegeben und der pH mit NaOH (0,5 N) über 2 h immer wieder auf 9 eingestellt. Durch Zugabe eines gleichen Volumens an Methanol wurde das Reagenz ausgefällt, anschließend wurde 10 min bei 1000 g zentrifu-



giert. Das Sediment wurde in heißem H_2O gelöst, dann wurde erneut mit Methanol ausgefällt und zentrifugiert. Das Sediment wurde in Wasser resuspendiert. Mit dieser Lösung wurde ein Spektrum aufgenommen (Abb. 5); die angegebenen Werte stimmen mit den Literaturdaten (YARIV et al., 1962) überein.

Das Reagenz wurde dann erneut präzipitiert und dann 36 h im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 26 %.

9.7.2. Präzipitation mutmaßlicher Arabinogalactan-Proteine aus dem Kulturfiltrat von Suspensionszellen oder aus dem Medium regenerierender Protoplasten

Das getrocknete Yariv-Reagenz wurde in 1 % (w/v) NaCl aufgenommen (1 mg/ml Stammlösung); für die Präzipitation wurde eine Lösung von 0,1 mg/ml verwendet. Das Reagenz bildet mit Arabinogalactan-Proteinen einen roten Farbkomplex, der nach kurzer Zeit ausfällt.
Durch Vortests wurde die erforderliche Menge an Yariv-Reagenz bestimmt. Die Proben wurden mit einem bestimmten Volumen des Reagenzes versetzt und nach 30 min zentrifugiert (10 min, 3000 g). Der Überstand wurde erneut mit Yariv-Reagenz versetzt; bei einer genügenden Menge an Yariv-Reagenz blieb dieses zweite Sediment farblos.
Die Proben wurden dann mit dem nach den Vortests als genügend ermittelten Volumen an Reagenz versetzt und nach 30 min zentrifugiert (10 min, 3000 g).
Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment zweimal mit 0,1 % (w/v) NaCl gewaschen, die vereinigten Überstände wurden zur Trockene eingeengt, der Rückstand in 1 ml NaOH (0,01 N) aufgenommen.
Das Sediment wurde ebenfalls in 0,01 N NaOH aufgenommen; der Komplex aus Arabinogalactan-Protein und Yariv-Reagenz geht dabei wieder in Lösung. Dann wurde erneut zentrifugiert, das dabei entstehende Sediment wurde nochmals mit NaOH resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die jeweiligen Überstände wurden vereinigt, das letzte Sediment verworfen.

9.7.3. Extraktion von Extensin aus der Zellwand von Suspensionszellen nach SELVENDRAN et al. (1975)

Aliquots von gereinigter und suspendierter Zellwand 5 d alter Suspensionszellen wurden abzentrifugiert (16000 g, 5 min). Die Sedimente wurden in den unten aufgeführten Lösungen resuspendiert. Mit H_2O, Phenol/Essigsäure/H_2O

(2:1:1), Deoxycholat (1 %; w/v) und $NaClO_2$-Lösung erfolgte eine Inkubation über 4 h im Wasserbad bei 70 °C. Die $NaClO_2$-Lösung wurde durch Zugabe von 2,5 µl Essigsäure und 0,62 g $NaClO_2$ (80 %) zu 1 ml H_2O hergestellt; stündlich wurden diese Mengen dem Inkubationsgemisch wieder zugesetzt. Ein weiteres Aliquot an Zellwandmaterial wurde in 3 M NaCl über 12 h bei 4 °C gerührt. Nach der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert (16000 g, 5 min) und die Sedimente in 1 ml H_2O resuspendiert. Alle Proben wurden 12 h bei 4 °C dialysiert und standen dann für Kohlenhydrat- und Hydroxprolintests zur Verfügung.

10. Trennung von Membranen über lineare Dichtegradienten

10.1. Isolierung von Protoplasten

Die Isolierung und Reinigung von Protoplasten erfolgte wie unter Ziffer 2 beschrieben. Es wurden 5 d alte Suspensionszellen als Ausgangsmaterial verwendet.

10.2. Homogenisierung

10.2.1. Protoplasten

Der Aufschluß erfolgte durch osmotische Lyse in Lysemedium (100 mM HEPES, 10 mM KCl, 150 mM Saccharose, pH 8); bei einigen Aufarbeitungen enthielt das Lysemedium zusätzlich DTT (1 mM) und/oder $MgSO_4$ (0,1 - 3 mM). Die sedimentierten Protoplasten wurden im Lysemedium resuspendiert (1,5 - 2 ml je Gramm Frischgewicht eingesetzter Suspensionszellen); das Lysat wurde auf Eis gestellt und regelmäßig geschüttelt. Die osmotische Lyse wurde durch Homogenisieren der Probe in einem Homogenisationsgefäß nach Potter-Elvehjem (Braun, Melsungen) unterstützt.
Nach der Lyse wurden die Proben 5 min bei 1000 g und 2 °C zentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ, Osterode), der

Überstand abgenommen und mit Saccharose-Lösung (50 %, w/w; 10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 8) auf eine Saccharose-Konzentration eingestellt, die 3 % (w/w) niedriger lag als der untere Wert des linearen Gradienten. Dieser Schritt unterblieb jedoch bei Gradienten mit Metrizamid oder Urografin als Gradientenmedium.

10.2.2. Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden mit einem Glas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit Teflonpistill (Braun, Melsungen) mit Lysemedium (1,5 ml je Gramm Frischgewicht an Zellen) aufgeschlossen; das Pistill wurde bei 900 Upm 12mal auf- und abbewegt. Das Homogenisationsgefäß wurde in einem Eisbad gekühlt, die Kolbenbewegungen waren von kurzen Pausen unterbrochen, um eine Erwärmung des Homogenats zu vermeiden. Nach einer Filtration über Miracloth wurde die Probe 5 min bei 1000 g zentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ, Osterode) und der Überstand wie unter 10.2.1. auf die gewünschte Saccharose-Konzentration eingestellt.

10.3. Lineare Dichtegradienten

Die linearen Gradienten wurden mit einem Gradientenmischgerät hergestellt; der Gradientenpuffer setzte sich aus 10 mM HEPES und 10 mM KCl zusammen und enthielt in einigen Fällen 1 mM DTT sowie $MgSO_4$ unterschiedlicher Konzentration (0,1 - 3 mM); das Volumen der Gradienten betrug 30 - 32 ml. Als Gradientenmedium wurde Saccharose, in einigen Fällen jedoch Metrizamid oder Urografin verwendet.
Die Proben wurden mit einer Glaspipette aufgetragen, dann wurde bei 25000 Upm (Swingout-Rotor SW27 oder 28, Kontron TGA 65) 3 - 15 h zentrifugiert (2 °C). Nach dem Lauf wurden die Gradienten mit Hilfe eines ISCO-Fraktionators (Modell 185, ISCO, Lincoln, USA) in Fraktionen aufgetrennt. Sollte das Sediment resuspendiert werden, wurden die Gradienten mit

Hilfe einer Pipette in Fraktionen zerlegt. Die Dichte der Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt; bei Gradienten mit Metrizamid oder Urografin als Medium wurden dabei die Formeln nach HINTON und MULLOCK (1976) zur Umrechnung herangezogen.

11. Isolierung von Membranen aus Protoplasten mit Hilfe von "micro-beads"

Unter dieser Ziffer werden jeweils die Bedingungen angeführt, die sich bei der Optimierung der Methode als günstig erwiesen. Abweichungen werden bei den Experimenten im Kapitel III angegeben.

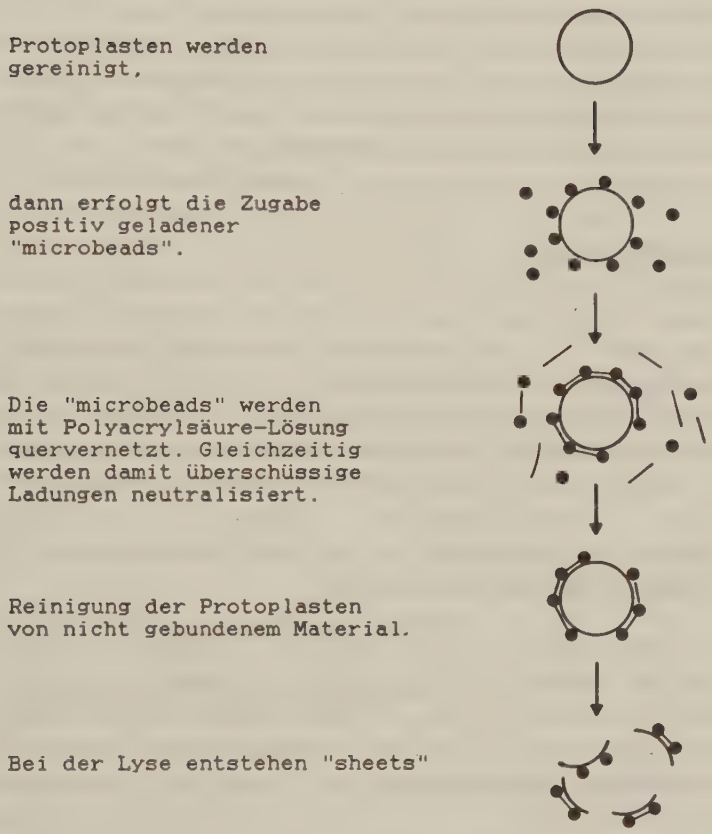
11.1. Isolierung und Reinigung der Protoplasten

Die Isolierung und Reinigung der Protoplasten erfolgte wie unter Ziffer 2 beschrieben.

11.2. Behaften ("Coating") der Protoplasten mit "microbeads" und Neutralisation überschüssiger Ladungen

Nach der letzten Zentrifugation wurden die Protoplasten in PI-3 resuspendiert (5 ml je 10^7 Protoplasten) und in einen Erlenmeyer-Kolben überführt; ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet.
Eine Suspension von "microbeads" in PI-3 (2,5 ml PI-3 auf 10^7 Protoplasten) wurde in kleinen Portionen zugefügt, die Protoplasten zwischendurch immer wieder geschüttelt, damit sie nicht sedimentierten.
5 µl einer 30 %igen Präparation an "microbeads" wurden auf 10^7 bzw. $1{,}5*10^7$ Protoplasten (je nach Alter und Charge der "microbeads") verwendet.
25 %ige Polyacrylsäure wurde mit 200 mM HEPES (pH 8) auf 5 % verdünnt. Von der 5 %igen Lösung wurden je 400 µl auf 10^7 Protoplasten benutzt. Das entsprechende Volumen wurde mit

Abb. 6: Darstellung der Plasmamembran mit Hilfe von "microbeads"



PI-3 ergänzt, sodaß ein Endvolumen von 2,5 ml je 10^7 Protoplasten verwendet wurde Der pH dieser Lösung wurde mit conc. KOH auf 6 eingestellt. Die Mischung wurde ebenfalls in kleinen Portionen zu der Protoplastensuspension gegeben, die Protoplasten wurden weiterhin regelmäßig geschüttelt. Durch Polyacrylsäure werden überschüssige Ladungen der "microbeads" neutralisiert und außerdem die "microbeads" untereinander quervernetzt, sodaß bei der Lyse größere "sheets" der

Plasmamembran entstehen (CHANEY und JACOBSON, 1983).
Der ganze Vorgang nahm etwa 15 min in Anspruch.
Danach wurden die Protoplasten zentrifugiert (5 min, 100 g), einmal in PI-3 und einmal in PI-3B gewaschen. Diese Schritte waren notwendig, um nicht gebundene "microbeads" und überschüssige Polyacrylsäure zu entfernen. PI-3B unterscheidet sich von PI-3 durch das Fehlen zweiwertiger Ionen.
Die ganze Prozedur ist schematisch in Abb. 6 dargestellt.

11.3. Homogenisierung

Die sedimentierten Protoplasten wurden im Lysemedium (100 mM HEPES, 10 mM KCl, 150 mM Saccharose, ± 1 mM DTT, pH 8) aufgenommen und 45 min auf Eis gestellt. Dabei wurde zwischendurch immer wieder geschüttelt. Die osmotische Lyse wurde durch Homogenisieren in einem Glas-Homogenisator mit Glaspistill nach Potter-Elvehjem (Braun, Melsungen) unterstützt.

11.4. Trennung der Membranen aus dem Lysat mit verschiedenen Zentrifugationstechniken

In diesem Punkt weisen die Experimente die größte Variabilität auf. Es wurden differentielle Zentrifugation, gestufte Dichtegradienten und lineare Dichtegradienten bei nieder- und hochtouriger Zentrifugation unterschiedlicher Dauer ausgeführt. Die Bedingungen werden beim jeweiligen Experiment explizit geschildert.

11.5. Markierung der Protoplasten-Oberfläche mit radioaktivem Concanavalin A

Vom üblichen Protokoll abweichend wurden die Protoplasten nach der Isolierung dreimal mit PI-3S gewaschen; PI-3S entspricht PI-3, wobei Saccharose fehlt.
Anschließend wurden die Protoplasten in PI-3S resuspendiert

(10^6 Protoplasten je ml); Aliquots wurden zur Bestimmung der Zellzahl verwendet.
$4*10^7$ Protoplasten wurden mit 0,4 µCi Concanavalin A (N-[acetyl-^{3}H] acetyliert) 5 min auf einem Rundschüttler (80 Upm) inkubiert. Danach wurde abzentrifugiert (5 min, 100 g) und die Protoplasten einmal mit PI-3S gewaschen. Ein Teil der Protoplasten wurde dann wie unter 11.3. beschrieben mit "microbeads" behaftet; die überschüssigen Ladungen wurden mit Polyacrylsäure neutralisiert und die Protoplasten zweimal gewaschen. Für diese Schritte wurde PI-3S anstelle von PI-3 benutzt. Als Kontrolle wurden parallel Protoplasten den gleichen Schritten ohne Zugabe von "microbeads" bzw. Polyacrylsäure unterworfen.
Die Lyse erfolgte mit Lysemedium LM-C (100 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM DTT, pH 8) 45 min auf Eis; ein Teil der Protoplasten wurde zusätzlich 10 sec mit Ultraschall (Sonifier Ultraschall Desintegrator, Branson, Heusenstamm; Microspitze; Stufe 5) behandelt. Die Proben wurden in 6 ml Unisolve I gezählt.

12. Bestimmung von Enzymaktivitäten

12.1. ATPase nach LIN und MORALES (1977)

K^+-stimulierbare, saure ATPase wird als Leitenzym des Plasmalemmas betrachtet (HODGES und LEONARD, 1974; CROSS und BRIGGS, 1976).
Das Testsystem für die Bestimmung der ATPase-Aktivität setzte sich folgendermaßen zusammen (Endkonzentrationen):

50 mM TRIS-MES, pH 6
3 mM $MgCl_2$
50 µM Ammoniummolybdat
±50 mM KCl
3 mM ATP

Der Testmix wurde (ohne ATP) bei 37 °C vorinkubiert. ATP wurde als Natriumsalz verwendet; es wurde in TRIS-MES-Puffer

gelöst und der pH durch Zugabe von NaOH auf 6 eingestellt, anschließend mit Puffer auf das gewünschte Endvolumen der Stammlösung aufgefüllt. Der Enzymtest wurde durch Zugabe von ATP und 50 µl Probe gestartet. Das Testvolumen betrug 1 ml, die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C.Danach wurde der Ansatz mit 1 ml Stoppreagenz versetzt und nach 3 min die Extinktion bei 366 nm vermessen (Gilford, Typ 250). Die Enzymaktivität einer Probe ergab sich als Differenz der Ansätze (je dreifach) mit bzw. ohne KCl.

12.2. Cytochrom C-Oxidase (E.C. 1.9.3.1.)

Der Reaktionsmix bestand aus einer Lösung von 0,5 mg/ml Cytochrom C in Phosphatpuffer (95 mM, pH 7,5) mit 0,01 % Digitonin; er wurde durch Zugabe von Natriumdithionit so eingestellt, daß das Verhältnis der Extinktionen bei 550 bzw. 565 nm (9-10):1 war.
Gleiche Volumina an Probe (20 -200 µl) und einer 0,02 %igen Lösung von Digitonin in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) wurden 30 min bis 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde Reaktionsmix bis zu einem Endvolumen von 2,1 ml zugegeben und die Extinktionsänderung bei 550 nm (Gilford, Typ 250) aufgezeichnet.

12.3. Cytochrom C-Reduktase

Der Testmix enthielt:

50 mM TRIS-MES, pH 7
3 mM $MgCl_2$
50 µM KCN
25 µM Cytochrom C
5 µM Antimycin

Antimycin wurde als 200fach konzentrierte Stammlösung in Ethanol angesetzt.
Ein geeignetes Volumen an Probe (10 - 100 µl) wurde mit Testmix auf 2050 µl aufgefüllt. Nachdem die Extinktions-

änderung bei 550 nm vermessen wurde (Grundsteigung), wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl NADH (10 mM) gestartet und erneut die Extinktionsänderung bei 550 nm vermessen (Gilford, Typ 250). Die Differenz der Steigungen (ΔE/min) ergab die Enzymaktivität.

12.4. Glucosyltransferasen

Die Messung der Glucosyltransferasen erfolgte nach den von INGOLD (1985) optimierten Bedingungen. Es handelt sich um modifizierte Ansätze der Testbedingungen für Glucansynthasen nach RAY (1979). Die Nomenklatur entspricht der von INGOLD (1985).
Die Inkubationszeiten betrugen für die GT I U 5 min, ebenso für die GT I G, für die GT II 10 min. Die Zusammensetzung des jeweiligen Reaktionsgemisches findet sich bei INGOLD und SEITZ (1986). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml TCA (5 %) abgestoppt, 100 µl Präzipitationshilfe (hitzedenaturierter 1000 g Überstand eines Rohhomogenates von *Daucus carota* Suspensionszellen) zugefügt und das Gemisch 1 min im Wasserbad gekocht.
Nach Zugabe von 1,5 ml Ethanol (98 %) wurden die Proben zur Präzipitation der Produkte mindestens 12 h bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (3000 g, 5 min) und das Sediment in 2 ml 98 % Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde noch dreimal auf diese Art vorgegangen, die resuspendierte Probe wurde in 6 ml Szintillator (PPO/POPOP/Toluol) überführt. UDP-[^{14}C]Glucose: 10,8 - 11 GBq/mmol, 925 kBq/ml; GDP-[^{14}C]Glucose: 8,87 GBq/mmol, 740 kBq/ml.

12.5. IDPase (E.C. 3.6.1.6.)

Testansätze enthielten:

50 mM TRIS-MES, pH 7
3 mM $MgCl_2$

± 0,15 mg*ml^{-1} Digitonin
2,4 mM IDP

und 20 – 50 µl Probe in einem Testvolumen von 1 ml. Nach Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von IDP und Probe gestartet; die Inkubationszeit betrug 1 h (37 °C). Die Reaktion wurde mit 1 ml Stoppreagenz beendet. Dabei wird freies Phosphat in einen Farbkomplex überführt. Die Messung erfolgte 3 min nach Zugabe der Stopplösung bei 366 nm (Gilford, Typ 250).

12.6. UDPG-Steroyl-Glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.35.)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach SAUER und ROBINSON (1985). Der Reaktionsmix enthielt:

60 mM TRIS, pH 8
7,5 mM $MgCl_2$
1 mM ß-Sitosterol
0,1 % (v/v) Triton X-100
0,1 mM UDP-Glucose (unmarkiert)
84 nM UDP-[^{14}C]Glucose (925 Bq*ml^{-1}Testmix)*

ß-Sitosterol wurde in Chloroform/Methanol (1:1) gelöst, dann Triton X-100 zugegeben. Chloroform und Methanol wurden bei 60 °C mit gefilterter Luft abgeblasen (FORSEE et al., 1974). Dann wurde bei 60 °C tropfenweise H_2O zugegeben, dazwischen gemischt, bis eine 5fach konzentrierte Stammlösung von ß-Sitosterol und Triton X-100 vorlag.
600 µl Testgemisch und 200 µl Probe wurden bei 30 °C 90 min inkubiert, die Reaktion mit 3 ml Chloroform/Methanol (2:3; v/v) beendet. Anschließend wurde 1 ml H_2O zugefügt, damit eine Phasentrennung eintrat. Die Ansätze wurden 10 min bei 3000 g zentrifugiert und dann die untere Phase mit einer Pipette in 6 ml PPO/POPOP/Toluol Szintillator überführt.

*: 10,8 – 11 GBq/mmol

13. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt, die auf der Bildung eines Farbkomplexes der Peptide mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 beruht. Rinderserumalbumin (BSA) wurde zur Erstellung der Eichkurve verwendet.

14. Bestimmung der Saccharose-Konzentration

Die Saccharose-Konzentration wurde refraktometrisch (Abbe-Refraktometer, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.) bestimmt.

15. Medien, Puffer und Lösungen

15.1. Medien

15.1.1. Medium für die Suspensionkultur

Das verwendete Nährmedium I,2a (SEITZ et al., 1985) stellt eine Modifikation des Mediums von MURASHIGE und SKOOG (1962) dar. Saccharose und Inosit wurden beim Ansetzen des Mediums eingewogen; Salze, Aminosäuren, Phytohormone und Vitamine aus Stammlösungen (100fach) zugesetzt. Der pH wurde bei Raumtemperatur auf 5,6 eingestellt. Je 0,5 l Medium wurden in 1L-Erlenmeyerkolben 20 min bei 115 °C autoklaviert. Eisen-EDTA wurde getrennt autoklaviert und dem Medium vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

Tab. 1: Zusammensetzung des I,2a-Mediums [$mg*l^{-1}$]

Saccharose	30 000	Nicotinsäure	0,5
m-Inosit	100	Thiamindichlorid	0,1
NH_4NO_3	1 650	Pyridoxolhydrochlorid	0,1
KNO_3	1 900	Indol-3-essigsäure	
$CaCl_2*2H_2O$	440	(IAA)	2,0

$MgSO_4*7H_2O$	370	2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4-D)	0,1
KH_2PO_4	170	Kinetin (6-Furfuryl-amino-purin)	0,2
Na_2*EDTA	37,2		
$FeSO_4*7H_2O$	27,8		
KJ	0,83		
H_3BO_3	6,3		
$MnSO_4*4H_2O$	22,3		
$Na_2MoO_4*5H_2O$	0,25		
$CuSO_4*5H_2O$	0,025		
$CoCl_2*6H_2O$	0,025		
$ZnSO_4*7H_2O$	8,6		

Das Medium enthält außerdem Aminosäuren in der Zusammensetzung nach KOBLITZ und HAGEN (1962), wobei Cystin durch Cystein (3mg*l^{-1}) ersetzt ist.

15.1.2. Medium für die Protoplastenisolierung (PI-3)

Das Medium PI-3 ist eine Abwandlung des Mediums I,2a und beruht auf der Arbeit von LANGEBARTELS (1981).

Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums PI-3 [mg*l^{-1}]

Saccharose	15 000	Nicotinsäure	0,5
m-Inosit	100	Thiamindichlorid	0,1
NH_4NO_3	1 650	Pyridoxolhydrochlorid	0,1
KNO_3	1 900	Mannit	45 000
$CaCl_2*2H_2O$	660	Sorbit	45 000
$MgSO_4*7H_2O$	370	Aminosäuren: wie I,2a-Medium	
KH_2PO_4	170		
Na_2*EDTA	7,5		
$FeSO_4*7H_2O$	5,6		
KI	0,83		
H_3BO_3	6,3		
$MnSO_4*4H_2O$	22,3		
$Na_2MoO_4*5H_2O$	0,25		

$CuSO_4*5H_2O$	0,025
$CoCl_2*6H_2O$	0,025
$ZnSO_4*7H_2O$	8,6

Mannit, Sorbit, Inosit und Saccharose wurden beim Ansetzen des Mediums eingewogen, die anderen Bestandteile wie beim I,2a-Medium aus Stammlösungen zugesetzt. Der pH wurde vor dem Autoklavieren auf 6,1 eingestellt, Eisen-EDTA wurde getrennt autoklaviert (115 C, 20 min). Das Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt.

15.1.3. Medium für die Protoplastenkultur (PC-6)

Das Medium PC-6 hatte die gleichen Bestandteile wie PI-3 und enthielt zusätzlich 1 $mg*ml^{-1}$ 2,4-D. Der pH wurde vor dem Autoklavieren auf 6,1 eingestellt. Nach dem Autoklavieren (115 °C, 20 min) wurde das Medium im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Fe*EDTA wurde getrennt autoklaviert und dem Medium vor der Benutzung unter sterilen Bedingungen zugefügt.

15.1.4. Medium PI-3B

Das Medium PI-3B enthielt alle Bestandteile des Mediums PI-3 außer zweiwertigen Ionen. Es wurde wie PI-3 angesetzt, autoklaviert und aufbewahrt. Vor der Benutzung wurde kein Fe*EDTA zugegeben.

15.1.5. Medium PI-3S

Das Medium PI-3S enthielt die Bestandteile des Mediums PI-3 bis auf Saccharose. Es wurde unter gleichen Bedingungen angesetzt, autoklaviert und aufbewahrt. Bei der Benutzung wurde auf die Zugabe von Fe*EDTA verzichtet.

15.2. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen zu einer bestimmten Methode finden sich unter der Ziffernfolge des Kapitels II.

2.

Enzymlösung zur Isolierung von Protoplasten:
Kurzzeitisolierung: 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka R10 und 0,2 % (w/v) Rhozyme HP150 in PI-3, pH 5,6
Lanzeitisolierung: 1,8 % (w/v) Cellulase Onozuka R10 in PI-3, pH 5,6

4.1.

Phenosafranin-Lösung: 0,1 % (w/v) Phenosafranin in PI-3

4.2.

Calcofluor-White-Lösung: 0,1 % (v/v) Calcofluor White ST in PI-3

4.3.

Phenosafranin-SDS-Lösung: 0,1 % (w/v) Phenosafranin, 1 % (w/v) SDS in PI-3

6.1.

Chromsäure-Lösung: 4,5 g Chrom-VI-oxid in 25,5 ml H_2O

7.

Phosphatpuffer: 100 mM NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 wurden bis zur Einstellung von pH 7,2 gemischt.

α-Amylase-Lösung zum Entfernen von Stärke:
30 - 60 Units α-Amylase in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2 mit 0,01 % Azid)

9.1.

Phenollösung: 80 % (w/w) Phenol

Glucose-Standard: 50 $\mu g * ml^{-1}$ Glucose

9.2.

Natriumtetraborat-Lösung: 12,5 mM in conc. Schwefelsäure

Hydroxybiphenyl-Lösung: 0,15 % (w/v) Hydroxybiphenyl in 0,5 % (w/v) NaOH

Galacturonsäure-Standard: 100 µg*ml^{-1} Galacturonsäure

9.3.

Essigsäure-Salpetersäure-Lösung: 10 Teile 80 % (v/v) Essigsäure; 1 Teil conc. HNO_3

Anthron-Lösung: 1 mg/ml Anthron in 75 % (v/v) H_2SO_4

Cellulose-Standard: 100 µg/ml Cellulose

9.4.

Acetat-Citrat-Puffer: 5,7 % (w/v) Natriumacetat, 3,75 % (w/v) Natriumcitrat, 38,5 % (v/v) Isopropanol mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt

Chloramin T-Lösung: 10 % (w/v) Chloramin T in H_2O

Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung: 5 % (w/v) p-Dimethylaminobenzaldehyd in Isopropanol

Phenolphthalein-Lösung: 0,1 % (w/v) in Ethanol

Hydroxyprolin-Standard: 50 µM Hydroxyprolin

9.5.1.

Chloroform-Methanol-Gemisch: Chloroform/Methanol 1:1 (v/v)

SDS-Lösung: 0,1 % (w/v) SDS

Natriumborhydrid-Lösung: 0,5 M $NaBH_4$ in 2 M NH_4OH

Inositol-Standard: 1 mg/ml Inositol

9.5.4.

Monosaccharid-Standards: Je 10 mg/ml

9.6.

EDTA-Acetat-Puffer: 50 mM EDTA, 50 mM Natriumacetat, pH 4,5

KOH-Natriumtetraborat-Lösung: 10 mM $NaBH_4$ in 24 % (w/v) KOH

9.7.1.

P-Aminophenyl-ß-D-Galactopyranosid-Lösung: 160 mM in HCl (0,5 N)

Natriumnitrit-Lösung: 400 mM Natriumnitrit

10.2.1.

Lysemedium: 100 mM HEPES, 10 mM KCl, 150 mM Saccharose pH 8; in einigen Fällen zusätzlich 1 mM DTT und/oder $MgSO_4$ (0,1 - 3 mM)

Saccharose-Lösung: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 50 % (w/w) Saccharose, ph 8

10.2.2.: siehe 10.2.1.

10.3.

Gradientenpuffer: 10mM HEPES, 10mM KCl; in einigen Fällen zusätzlich 1mM DTT, außerdem $MgSO_4$ (0,1 - 3 mM); als Gradientenmedium wurde Saccharose, bei einigen Experimenten jedoch Metrizamid oder Urografin verwendet.

11.2.

Polyacrylsäure-Lösung: 1 Teil Polyacrylsäure (25 %) und 4 Teile HEPES (200 mM, pH 8); (v/v)

11.3.

Lysemedium: 100 mM HEPES, 10mM KCl, 150 mM Saccharose, pH 8; in einigen Experimenten zusätzlich 1 mM DTT

11.5.

Lysemedium-C: 100 mM HEPES, 10 mM KCl, 1mM DTT, pH 8

Concanavalin A, N-[acetyl-^{3}H]acetyliert:
50 µCi Concanavalin A (36 Ci/mMol; 327 µCi/mg) mit 7,25 mg NaCl wurden in 250 µl H_2O gelöst.

12.1.

Substratpuffer: 50mM TRIS-MES, 3 mM $MgCl_2$, 50 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 3 mM ATP, ±50 mM KCl

Stoppreagenz: 10 g Ammoniummolybdat, 1 ml NH_4OH (0,9 g/ml), 0,235 g NH_4VO_3, 37,61 ml HNO_3 (1,42 g/ml), 20 g SDS je Liter

12.2.

Inkubationspuffer: 0,02 % (w/v) Digitonin in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)

Reaktionspuffer: 0,5 mg/ml Cytochrom C in Phosphatpuffer (95 mM, pH 7,5) mit 0,01 % (w/v) Digitonin

12.3.

Substratpuffer: 50 mM TRIS-MES, 3 mM $MgCl_2$, 50 µM KCN, 25 µM Cytochrom C, 5 µM Antimycin, 0,25 mM NADH, pH 7,5

12.4.

Testpuffer: 95 mM TRIS-Acetat, pH 7,5

Szintillationscocktail: 4 g Premix 4 (91 % PPO, 9 % Dimethyl-POPOP pro Liter Toluol

12.5.

Substratpuffer: 50 mM TRIS-MES, 3mM $MgCl_2$, 2,4 mM IDP, ±0,15 mg/ml Digitonin, pH 7

12.6.

Reaktionsgemisch: 60 mM TRIS (pH 8), 7,5 mM $MgCl_2$, 1 mM ß-Sitosterol, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 mM UDP-Glucose (nicht markiert), 84 nM UDP-[^{14}C]Glucose (925 kBq/ml, 11 GBq/mmol

Chloroform-Methanol-Gemisch: Chloroform/Methanol 2/3 (v/v)

Szintillationscocktail: s. 12.4.

13.

Testlösung: 25 mg Coomassie Blue G 250 in 12,5 ml Ethanol (95 %) und 25 ml Phosphorsäure (85 %) vorlösen, auf 250 ml auffüllen und zweimal filtrieren

16. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

16.1. Chemikalien

American Cyanamid Company, Bound Brook, USA:
Calcofluor White ST

Amersham Buchler, Braunschweig:
Concanavalin A, N-[acetyl-^{3}H]acetyliert;
Uridin-diphospho-D-[U-^{14}C]Glucose, Ammonium-Salz;

Boehringer, Mannheim:
ATP, UDP-Glucose

EGA Chemie, Steinheim:
Polyacrylsäure; Trifluoressigsäure 99 %

Fluka, Neu-Ulm:

D-Galacturonsäure reinst; Hydroxybiphenyl rein;
D-Mannose p.a.; Natriumtetraborat p.a.

Hedinger, Stuttgart:
Essigsäure 99/100 % rein

Merck, Darmstadt:
ß-Sitosterol 85 %

Merck-Schuchard:
Natriumborhydrid zur Synthese

Messer-Griesheim:
Argon; Helium; Stickstoff; synth. Luft; Wasserstoff

New England Nuclear, Dreieich:
Guanosin-diphospho-D-[U-^{14}C]Glucose, Natriumsalz

Nyegaard, Oslo:
Metrizamid

Pollock and Pool, Reading, Großbritannien:
Rhozyme HP150

Roth, Karlsruhe
Natriumchlorit, 80 %

Schering, Berlin:
Urografin

Serva, Heidelberg:
L-Arabinose; Digitonin; L-Fucose reinst; Triton X-100;
D-Xylose reinst

Sigma, München:
α-Amylase I-A aus Schweinepankreas; p-Aminophenyl-

ß-D-galactosid; Anthron; BSA; α-Cellulose, Coomassie Brilliant Blue G 250; EGTA; D-Galactose; HEPES; IDP; MES; Phloroglucin

Yakult Honsha Co., Ltd., Tokyo, Japan
Cellulase Onozuka R10

Zinsser, Frankfurt:
Premix 4; Unisolve I

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, in p.a.-Qualität bezogen. Alle wäßrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Von Prof. Jacobson (Department of Biochemistry, University of Massachusetts, USA) wurden mir freundlicherweise mehrere Präparationen etwa 30%iger Suspensionen von "microbeads" zur Verfügung gestellt.

16.2. Verbrauchsmaterial

Calbiochem (Päsel, Frankfurt):
Miracloth

Greiner, Nürtingen:
Sterile Plastikpetrischalen

Sartorius, Göttingen:
Membranfilter

Serva, Heidelberg:
Visking Dialysierschläuche 36/32, Auschlußgrenze 8-15 kDa

Thoma, Mössingen:
Nylonnetze, 140, 100 und 60 µm

17. Abkürzungen

AGP	Arabinogalactan-Protein
ARA	Arabinose
ATP	5'-Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat Hydrolase
BSA	Rinderserumalbumin
CCR	Cytochrom C-Reduktase
CCO	Cytochrom C-Oxidase
cpm	Impulse pro Minute
CWP	Zellwand-Polysaccharide
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
DCB	2,6-Dichlorbenzonitril
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECP	Extrazelluläre Polysaccharide
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(ß-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FUC	Fucose
g	Erdbeschleunigung
GAL	Galactose
GDPG	Guanosindiphospho-Glucose
GLC	Glucose
GT I G	Glucosyltransferase mit GDPG (µM) als Substrat
GT I U	Glucosyltransferase mit UDPG (µM) als Substrat
GT II U	Glucosyltransferase mit UDPG (mM) als Substrat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl-(1)]-ethansulfonsäure
IAA	Indol-3-essigsäure
IDPase	Inosindiphosphat Hydrolase
I,2a	Nährmedium für die Suspensionskultur
MAN	Mannose

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
PAS	Polyacrylsäure
PC-6	Medium für die Kultur der Protoplasten
PI-3	Medium für die Isolierung der Protoplasten
PI-3B	PI-3 ohne zweiwertige Ionen und EDTA
PI-3S	PI-3 ohne Saccharose und Fe*EDTA
POPOP	2,2'-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RHA	Rhamnose
RRF	"relative response factor"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT	UDPG-Steroyl-Glucosyltransferase
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UA	Uronsäuren
UDP	5'-Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphospho-Glucose
Upm	Umdrehungen pro Minute
XYL	Xylose

III. ERGEBNISSE

A) Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei Suspensionszellen und regenerierenden Protoplasten

1. Charakterisierung der verwendeten Zellinie DC_{81}

Die Zellinie DC_{81} hatte bei der Charakterisierung eine Passagenzahl von 264. Die Suspensionskultur war also vor etwa 5 Jahren aus Kallus angelegt worden. Die Zellen zeigten keinerlei Akkumulation an Anthocyanen mehr. Abb. 7 zeigt den Verlauf der wichtigsten Wachstumsparameter. Nach der Anlaufphase von etwa drei Tagen nach dem Überimpfen erfolgt eine rasche Zunahme der Zellzahl (Abb. 7a) bis zum 7. Tag; die Teilungsphase ist bei dieser Zellinie mittlerweile auf einen sehr engen Zeitraum begrenzt. Frischgewicht und Trockengewicht (Abb. 7b und c) nehmen bis zum 8. Tag zu, das "gepackte Zellvolumen" (Abb. 7d) noch darüber hinaus. Es überlagern sich also am Ende zwei gegenläufige Tendenzen: Ein Teil der Zellen stirbt ab, da das Nährmedium erschöft ist; die verbliebenen Zellen sind durch eine zusätzliche Wasseraufnahme gekennzeichnet.
Das zeitlich eng begrenzte, rasche Teilungswachstum der Kultur wird auch aus der Zellzahl je Gramm Frischgewicht deutlich: Ein steiler Anstieg erfolgt zwischen dem 3. und 4. Tag, der Ausgangswert wird am 7. Tag wieder erreicht (Abb. 7d).
Die Kultur war im mikroskopischen Bild sehr fein und homogen. Die Darstellung von Protoplasten aus 5 d alten Suspensionszellen war mit einer sehr hohen Ausbeute möglich. Zusammen mit der raschen Vermehrung der Zellen bis zu diesem Zeitpunkt waren für die Untersuchungen sehr gute Bedingungen gegeben: Sowohl für die Isolierung von Protoplasten als auch für die direkte Untersuchung der Suspensionszellen stand genügend und sehr homogenes Material zur Verfügung.

Wegen der zeitlich sehr eng begrenzten Wachstumsphase war es allerdings notwendig, alle sich entsprechenden Präparationen mit den Zellen zu vergleichbaren Zeitpunkten durchzuführen, da sonst große Schwankungen auftreten konnten. Dies gilt sowohl für das Überimpfen als auch für das Alter derjenigen Zellen, die für die Herstellung von Protoplasten benutzt wurden.

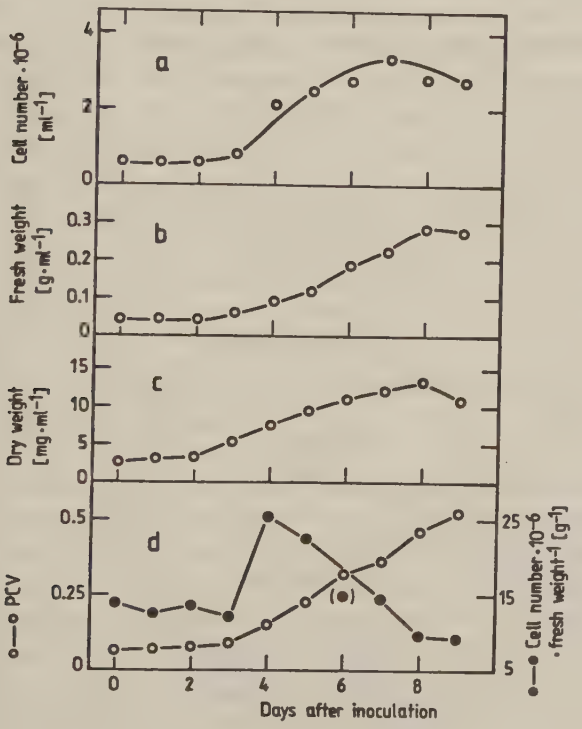


Abb. 7: Verlauf verschiedener Parameter der Zellkultur DC_{81} in Abhängigkeit vom Kulturalter.
a) Zellzahl
b) Frischgewicht
c) Tockengewicht
d) "gepacktes Zellvolumen" (offene Symbole) und Zellzahl je Gramm Frischgewicht (ausgefüllte Symbole).

2. Untersuchungen zur Zellwand und den extrazellulären Polysacchariden von Suspensionszellen

2.1. Menge an Zellwandmaterial im Verlauf der Kultivierung

Schon die Charakterisierung des Wachstums der Kultur anhand weniger Eigenschaften läßt vermuten, daß viele physiologischen Parameter Änderungen unterworfen sind. So tritt eine Zellteilung erst einige Zeit nach dem Überimpfen auf. Dann erfolgt sehr rapides Teilungswachstum. In dieser Phase ist die Zellzahl je Gramm Frischgewicht sehr hoch, d.h. die Zellen sind kleiner. Während das Teilungswachstum allmählich

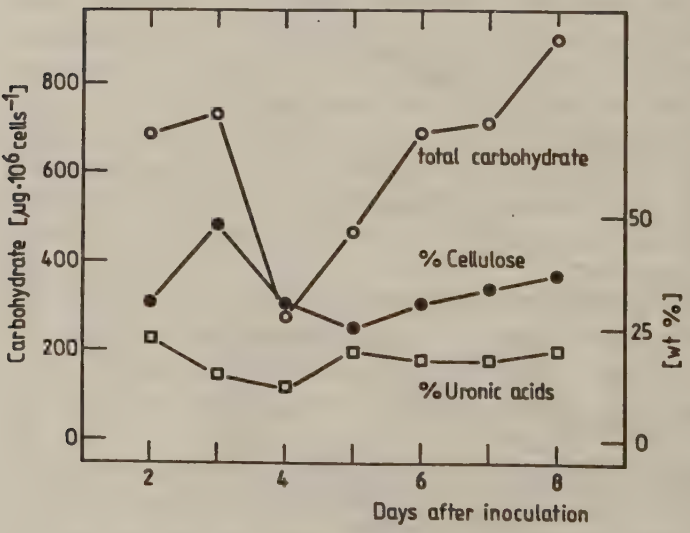


Abb. 8: Menge an Kohlenhydraten in der Zellwand der Kultur DC_{81} im Verlauf des Kulturalters. Die Uronsäuren (□–□) wurden mit der Hydroxybiphenylmethode bestimmt. Gesamtkohlenhydrat (o–o) wurde aus dem Phenol-Schwefelsäure-Test unter Addition von 2/3 der Menge an Uronsäuren berechnet. Cellulose (●–●) wurde nach UPDEGRAFF (1969) bestimmt.

zum Stillstand kommt, nehmen die Zellen vermehrt Wasser auf und werden größer. Es ist zu vermuten, daß diese Änderungen auch in der Zellwand manifest werden. Wie bei der Charakterisierung wird zu jedem Zeitpunkt ein Durchschnittswert ermittelt, der Unterschiede zwischen Zellen der nicht synchronen Kultur nicht wiedergibt.
Abb. 8 zeigt die Menge an Kohlenhydraten in der Zellwand, bezogen auf 10^4 Zellen. Bemerkenswert ist der rasche Abfall auf unter 300 µg pro 10^4 Zellen vom 3. auf den 4. Tag der Kultur ; er korreliert mit der plötzlichen Zunahme an Zellen je Gramm Frischgewicht (Abb. 7d). Danach nimmt die Menge an Zellwandmaterial wieder zu, wobei nur die Zellpopulation als Ganzes erfaßt wird. Dabei ändert sich ebenfalls der Anteil von Cellulose an der Zellwand; er ist am 5. Tag am niedrigsten. Insgesamt stimmt der Prozentsatz an Cellulose mit den bekannten Daten für Suspensionszellen überein. Auch der Gehalt an Uronsäuren ändert sich im Verlauf des Kulturalters, allerdings in geringerem Umfang als bei der Cellulose.

2.2. Extrazelluläre Polysaccharide im Verlauf der Kultivierung

Suspensionszellen scheiden Polysaccharide und Glycoproteine ins Medium ab. Häufig ähneln diese Bausteine gewissen Komponenten der Zellwand (BAUER et al., 1973; CHAMBAT et al., 1981). Allerdings könnten einige Wandbestandteile selektiv oder doch zumindest in anderem Umfang sezerniert werden. Möglicherweise können diese Komponenten nicht rechtzeitig in das Gerüst der Zellwand verknüpft werden und erscheinen deshalb im Medium. Bei *Phaseolus vulgaris* werden jedoch gezielt Arabinogalactan-Proteine in den extrazellulären Raum abgeschieden; auch bei Zellkulturen von *Acer pseudoplatanus* sind die hydroxyprolinreichen Glycoproteine des Mediums überwiegend Arabinogalactan-Proteine (POPE, 1977) und nicht, wie früher angenommen, Extensin.

In methodischer Hinsicht bietet die Untersuchung der extrazellulären Polysaccharide von Zellkulturen mancherlei Vorteile:
Das Material kann relativ einfach durch Filtration und Dialyse gewonnen werden; es entfallen Extraktions- und Reinigungsschritte mit der Gefahr des Verlustes oder der Änderung von Komponenten. Es gibt keine Kontamination der Präparation durch cytoplasmatische Bestandteile, wie dies bei der Darstellung der Zellwand der Fall sein kann.
Abb. 9 zeigt die Menge an Polysacchariden je ml Zellsuspension im Verlauf der Kultivierung. Erstaunlich ist, daß nach einem Maximum am 5. Tag eine stetige Abnahme zu verzeichnen ist. Es ist möglich, daß ein enzymatischer Abbau der bis dahin gebildeten extrazellulären Polysaccharide stattfindet. Die dabei entstehenden Mono- oder Oligosaccharide könnten entweder wieder von der Zelle aufgenommen werden oder bei der Dialyse des Mediums verloren gehen.

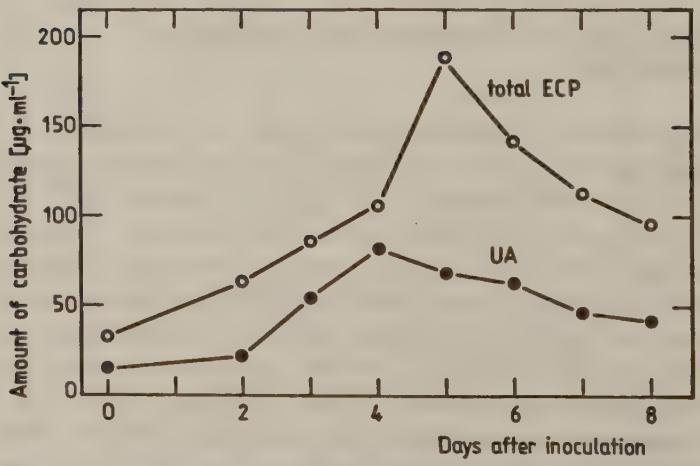


Abb. 9: Menge an Kohlenhydraten im Kulturfiltrat der Zellinie DC_{81} im Verlauf der Kultivierung. Die Bestimmung der Kohlenhydrate efolgte wie bei Abb. 8 angegeben.

Denkbar erscheint ebenfalls, daß ein Teil des sezernierten Materials nachträglich in die Zellwand integriert wird. Die Menge an Zellwandmaterial je 10^6 Zellen nimmt ja noch zu, wenn die Zellzahl der Kultur sich nicht mehr erhöht. Der hohe Wert, den das "gepackte Zellvolumen" erreicht, macht diesen Vorgang durchaus wahrscheinlich.

2.3. Weitere Charakterisierung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide von Suspensionszellen

Für eine genauere Charakterisierung wurden 5 d alte Suspensionskulturen ausgewählt, da aus diesen Zellen auch die Protoplasten für die Beobachtung der Zellwand-Regeneration gewonnen wurden. Bei der Fraktionierung wurde zum Vergleich zusätzlich eine 9 d alte Kultur herangezogen.

2.3.1. Zuckerzusammensetzung der Zellwand

Abb. 10 zeigt die gaschromatographisch ermittelte prozentuale Verteilung der Monomeren. Cellulose wird bei dieser Aufarbeitung nicht oder nur z.T. erfaßt, da die Hydrolyse mit 2 M TFA erfolgt. Ebenfalls nicht erfaßt werden Uronsäuren. Auffällig ist zunächst, daß Arabinose (32 %) eindeutig dominiert. Glucose (21 %) und Galactose (18 %) sind gleichfalls stark vertreten. Alle anderen bislang identifizierten Zucker liegen unter 10 %. Der Anteil der nicht identifizierten "peaks" betrug bei der gezeigten Aufarbeitung 9 %, wobei nicht auszuschließen ist, daß Abbauprodukte oder Verunreinigungen vorliegen.

2.3.2. Neutrale Monosaccharide der extrazellulären Polysaccharide

Zunächst gelten hinsichtlich der Aufarbeitung die gleichen Bemerkungen wie bei der Zellwand. Es sind die gleichen

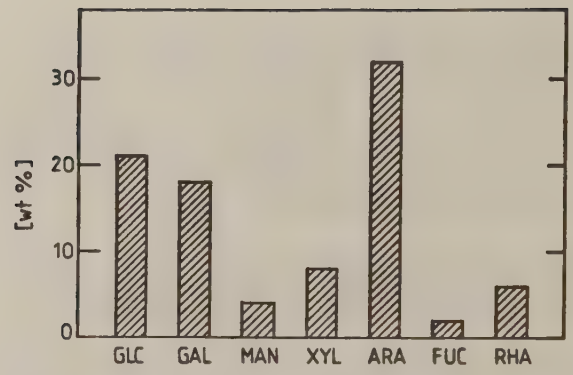


Abb. 10: Neutralzuckerzusammensetzung der Zellwand (außer Cellulose) 5 Tage alter Suspensionszellen. GLC = Glucose, GAL = Galactose, MAN = Mannose, XYL = Xylose, ARA = Arabinose, FUC = Fucose, RHA = Rhamnose

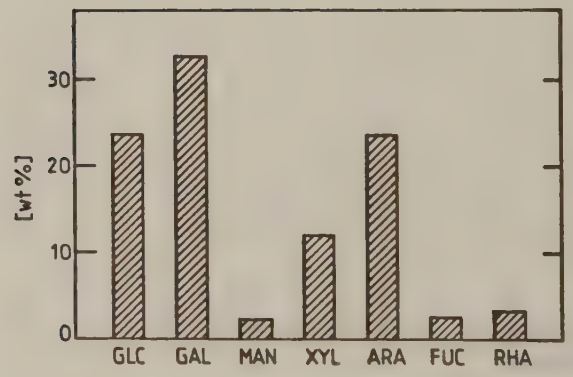


Abb. 11: Neutralzuckerzusammensetzung der extrazellulären Polysaccharide (außer Cellulose) einer 5 Tage alten Suspensionskultur. Abk. s. Abb. 10.

Zucker dominierend, wobei Galactose (33 %) und Arabinose (24 %) die Plätze in der Rangfolge getauscht haben (Abb. 11).
Nun besagt die prozentuale Verteilung der Zucker noch nichts über die Eigenschaften der Produkte, die durch die Verknüpfung der Monomeren entstehen. Jedoch können Unterschiede, auch ohne Kenntnis der Bindungstypen, der Verzweigungen oder des Polymerisationsgrades, schon bei der Fraktionierung der Polysaccharide nach chemischen Kriterien deutlich zutage treten.

2.3.3. Fraktionierung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide in Pektin, Hemicellulose und Cellulose

Pektin, Hemicellulose und Cellulose gelten als die Hauptklassen an Polysacchariden in der Zellwand. Nach YORK et al. (1986) sind die Pektine durch einen hohen Gehalt an Galacturonsäure gekennzeichnet, die Hemicellulosen hingegen durch ihre Fähigkeit, mit Cellulose Wasserstoff-Brücken auszubilden. Die Definition von Cellulose läßt sich schärfer fassen, z.B. über die Kristallinität; die Cellulose-Frakton ist jedoch bei der Fraktionierung nie ganz rein.
In der Regel stimmt diese Charakterisierung mit den Resultaten überein, die man mit den gängigen Methoden der Fraktionierung erhält. Da jedoch, wenn auch meist nur in Details, die Methodik variiert, steckt eine gewisse Willkür in dieser Einteilung der Polysaccharide in die drei genannten Klassen.
Abb. 12 zeigt die Anteile der jeweiligen Fraktion an der Zellwand und den extrazellulären Polysacchariden bei 5 und 9 Tage alten Suspensionskulturen. Bei beiden Zeitpunkten dominieren bei den extrazellulären Polysacchariden die Pektine mit jeweils etwa 90 % ganz eindeutig. In der Zellwand umfaßt bei 5 Tage alten Kulturen die Hemicellulose-Fraktion 47 %, die Pektine 30 %, während Cellulose mit 23 % einen relativ niedrigen Anteil hat. Der Wert für Cellulose stimmt mit dem Ergebnis aus der Kulturalterabhängigkeit gut überein; dort

wurde die Cellulose mit einer anderen Methode (UPDEGRAFF, 1969) bestimmt.

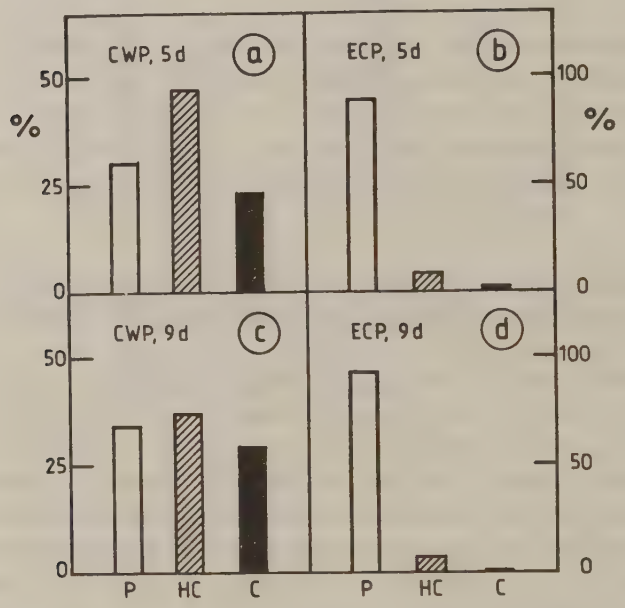


Abb. 12: Fraktionierung der Zellwände und extrazellulären Polysaccharide 5 und 9 Tage alter Suspensionskulturen. Die Bestimmung der Kohlenhydrate erfolgte mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode und Addition von 2/3 der Menge an Uronsäuren im Hydroxybiphenyl-Test.
P = Pektine; HC = Hemicellulose; C = Cellulose.

In der Zellwand 9 Tage alter Zellen sind die Anteile der Fraktionen ähnlich, dabei dominiert immer noch die Hemicellulose-Fraktion mit 37 %.

Tab. 3 zeigt die Verteilung der Uronsäuren auf die einzelnen Fraktionen der Zellwand.

Es fällt auf, daß die Uronsäuren keinesfalls ausschließlich in der Pektinfraktion auftreten, sondern bei 5 d alten Zellen sogar mehrheitlich in der Hemicellulose-Fraktion vorhanden sind.

Tab. 3: Verteilung der Uronsäuren auf die einzelnen Fraktionen der Zellwand. Zellwände wurden fraktioniert und die Uronsäuren mit der Hydroxybiphenyl-Methode bestimmt.

Alter der Kultur:	5 Tage	9 Tage
Fraktion:		
Pektine	42 %	50 %
Hemicellulose	53 %	41 %
Cellulose	5 %	9 %

2.3.4. Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Zellwand-Fraktionen

Um nähere Hinweise auf die Bausteine der Zellwand zu bekommen, wurden die Fraktionen der Zellwand 5 Tage alter Suspensionszellen auf ihren Gehalt an neutralen Monosacchariden untersucht. Damit lassen sich erste Hinweise auf die

Tab. 4: Anteile der neutralen Monosaccharide in den Fraktionen der Zellwand. Die Hydrolyse der Pektin- und Hemicellulose-Fraktion wurde mit TFA, die der Cellulose-Fraktion mit H_2SO_4 durchgeführt. Die Auftrennung der Alditolacetate erfolgte gaschromatographisch; die Angaben erfolgen in Gewichtsprozenten.

Fraktion	Pektin	Hemicellulose	Cellulose
Monosaccharid			
Rhamnose	1	2	2
Fucose	–	tr	2
Arabinose	31	40	10
Xylose	2	2	2
Mannose	3	11	15
Galactose	5	23	6
Glucose	58	22	63

tr: In Spuren vorhanden

in den einzelnen Fraktionen vorhandenen makromolekularen Bausteine gewinnen.
Es fällt auf, daß die Cellulose-Fraktion nicht ausschließlich Glucose enthält. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein; ASAMIZU und NISHI (1979) fanden ebenfalls bei Zellkulturen von Karotten 63 % Glucose in der Cellulose-Fraktion.

2.3.5. Absolute Menge an Polysacchariden in der Zellwand und im Kulturfiltrat 5 Tage alter Suspensionszellen

Zum Abschluß des Abschnittes 2.3. soll eine Zusammenstellung über die absoluten Mengen an Kohlenhydraten der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide aus verschiedenen Aufarbeitungen gegeben werden. Tab. 5 zeigt die Menge an Polysacchariden in der Zellwand. Aufarbeitung I erfolgte 23 Passagen nach der Charakterisierung der Kulturalterabhängigkeit, die zweite weitere 18 Passagen später.

Tab. 5: Menge an Polysacchariden in der Zellwand 5 Tage alter Suspensionskulturen. Die Menge an Kohlenhydraten wurde mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode und der Hydroxybiphenyl-Methode bestimmt. Bei 3 oder mehr Parallelproben wird die Standardabweichung in Klammern angegeben.

Menge an Kohlenhydrat	µg*(10^4 Zellen)$^{-1}$	mg*(g FG)$^{-1}$
Aufarbeitung I:		
Zellwand, unfraktioniert	658	15,8
Summe der Fraktionen	643 (113)	15,4 (2,7)
Aufarbeitung II:		
Zellwand, unfraktioniert	642 (33)	13,9 (0,7)
Summe der Fraktionen	615 (28)	13,3 (0,6)

Die Werte beider Aufarbeitungen liegen deutlich höher als der entsprechende Wert der Kulturalterabhängigkeit und entspricht dort dem 6. Tag. Es war bei der Bestimmung des Frischgewichts eine Änderung des Wachstumverhaltens zu beobachten, nach der Aufarbeitung I blieb dann die Kultur $DC_{5,1}$ hinsichtlich der Wachstumparameter stabil.
Tab. 6 zeigt die entsprechenden Werte für die extrazellulären Polysaccharide. Am 5. Tag ist die Menge der extrazellulären Polysaccharide etwa 1/7 (14,5 %) der Menge der Polysaccharide der Zellwand.

Tab. 6: Menge an Polysacchariden im Kulturfiltrat 5 Tage alter Suspensionskulturen. Die Menge an Kohlenhydraten wurde mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode und der Hydroxybiphenyl-Methode bestimmt. Bei 3 oder mehr Parallelproben wird die Standardabweichung in Klammern angegeben.

Menge an Kohlenhydrat	µg/ (10^6 Zellen)	mg/(g FG Zellen)	mg/ml Zellsuspension
Aufarbeitung I: Summe der Fraktionen	80 (5)	1,9 (0,1)	239 (16)
Aufarbeitung II: ECP, unfraktioniert	98 (6,5)	2,1 (0,1)	212 (14)
Summe der Fraktionen	100 (12,6)	2,2 (0,3)	216 (27)

Die extrazellulären Polysaccharide unterscheiden sich hintichtlich der Zusammensetzung und im Verhalten bei der Fraktionierung.
Der Anteil an Uronsäuren am Gesamtkohlenhydrat beträgt bei den extrazellulären Polysacchariden 23 (±4) %, in der Zellwand beträgt er lediglich 12 (±2) %.

3. Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei regenerierenden Protoplasten

LANGEBARTELS (1981) konnte in unserem Labor bei regenerierenden Protoplasten den Einbau von radioaktiv markierter Glucose in säureunlösliches Material (Test auf Cellulose nach UPDEGRAFF, 1969) nachweisen; mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde eine im Verlauf der Kultivierung zunehmende Einlagerung von Mikrofibrillen in die neu gebildete Zellwand beobachtet. Vom gleichen Autor wurde ebenfalls der Verlauf der Aktivität der Glucansynthasen I und II während der Kultivierung verfolgt.
Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen. So sollte als Ergänzung zum beschriebenen Einbau von markierter Glucose in säureunlösliches Material geklärt werden, welchen Anteil die Cellulose in der regenerierten Zellwand einnimmt. Die Zellwand regenerierender Protoplasten sollte biochemisch näher charakterisiert werden, um einen Vergleich mit den *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten zu ermöglichen. Weiterhin wurde eine Gegenüberstellung korrespondierender Daten zu den Untersuchungen an Suspensionszellen angestrebt.

3.1. Zeitlicher Verlauf der Zellwand-Regeneration

Als erstes wurde die Bildung der gesamten Zellwand im Verlauf der Kultivierung erfaßt. Abb. 13 zeigt die Menge an Gesamtkohlenhydrat, an Uronsäuren und Cellulose im Verlauf der Kultivierung. Die Protoplasten haben nach dem 3. - 4. Tag bereits wieder eine Zellwand regeneriert, die mengenmäßig in der Größenordnung der Suspensionszellen liegt. Dabei ist der Gehalt an Cellulose sehr gering; er schwankt um 10 %.
Tab. 7 enthält die Prozentwerte für die Anteile der Uronsäuren bzw. Cellulose am gesamten Kohlenhydrat der Zellwand.
Im Kulturmedium findet ebenfalls eine beachtliche Akkumulation an Polysacchariden statt (Abb. 14). Cellulose (säureun-

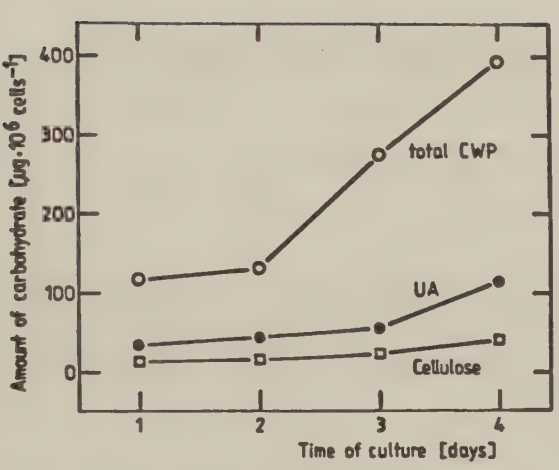


Abb. 13: Verlauf der Zellwandregeneration von Protoplasten. Die Kohlenhydrate wurden wie unter Abb. 8 angegeben bestimmt. Total CWP = Gesamtkohlenhydrat der Zellwand; UA = Uronsäuren.

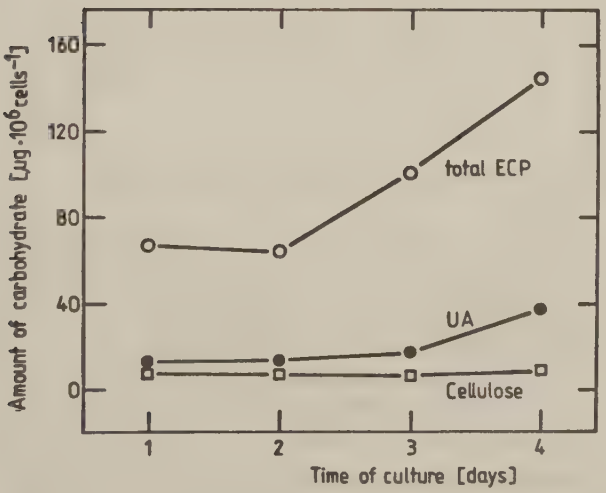


Abb. 14: Menge an extrazellulären Polysacchariden im Verlauf der Regeneration von Protoplasten. Die Kohlenhydrate wurden wie unter Abb. 8 angegeben bestimmt. Total ECP = Gesamtkohlenhydrat der ECP; UA = Uronsäuren.

Tab. 7: Anteil von Uronsäuren und Cellulose am gesamten Kohlenhydrat der Zellwand regenerierender Protoplasten

Tag der Kultivierung	1	2	3	4
% Uronsäuren	32	36	20	30
% Cellulose	13	13	11	10

lösliches Material nach UPDEGRAFF, 1969) tritt wiederum nur in geringer Menge auf. Tab. 8 gibt das Verhältnis der extrazellulären in Bezug auf die gesamten Kohlenhydrate der Zellwand wieder.

Tab. 8: Verhältnis der extrazellulären Polysaccharide zur Zellwand. Die gesamte Menge der Kohlenhydrate der Zellwand wurde jeweils 100 % gesetzt.

Tag der Kultivierung	1	2	3	4
% ECP	58	49	37	37

Es wird also prozentual ein wesentlich größerer Anteil der Polysaccharide ins Medium abgegeben als bei den Suspensionszellen (vgl. 2.3.5.).

3.2. Anmerkungen zur Methodik der Zellwand-Isolierung

Bei der Darstellung der Zellwände wird die Sedimentation durch Zugabe von Ethanol unterstützt; dies birgt die Gefahr, daß auch cytoplasmatisches Material erfaßt wird und so die Präparationen verfälscht werden. Die Fällbarkeit in 70 % Ethanol wird auch als Kriterium für die Produkte der Glucansynthasen angewendet; ab einem bestimmten Polymerisationsgrad (etwa 8 Glucose-Einheiten) werden die Produkte ausgefällt. Bei der Präparation der Zellwand wird eine Behandlung mit α-Amylase durchgeführt, so daß Stärke bzw. die Abbauprodukte ebenso wie Nukleotid-Zucker oder Monosaccharide

bzw. Disaccharide nicht zur Verunreinigung beitragen sollten. Allerdings können z.B. Glycoproteine erfaßt werden.
Bei der unter III.3.1. dargestellten Regeneration betrugen die Werte frisch isolierter Protoplasten 54 µg bei den "Zellwänden" sowie 11 µg bei den extrazellulären Polysacchariden, bezogen auf 10^6 Zellen. Im mikroskopischen Bild hatte bei der Beobachtung mit Calcofluor White bzw. Phenosafranin-SDS-Lösung nur ein sehr kleiner Prozentsatz (etwa 5 %) der Protoplasten noch Reste an Zellwand. Deshalb wurden bei einigen Experimenten die Darstellung der Zellwand bzw. der extrazellulären Polysaccharide ohne Ethanol durchgeführt. Abb. 15 zeigt den Verlauf der Zellwand-Bildung bei einem dieser Experimente.

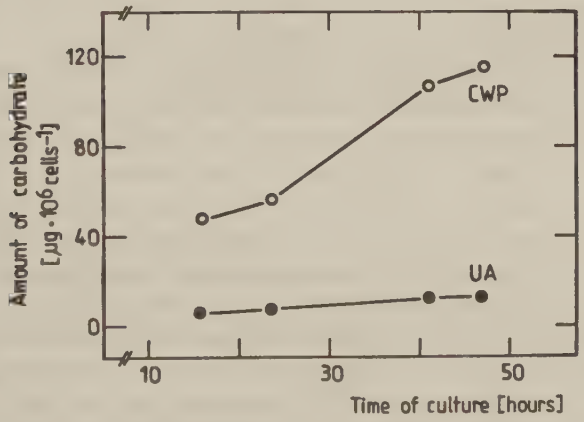


Abb. 15: Verlauf der Zellwandregeneration von Protoplasten. Bei diesem Experiment wurde bei der Isolierung der Kohlenhydrate auf die Zugabe von EtOH verzichtet. Die Bestimmung des Gesamtkohlenhydrates (CWP) und der Uronsäuren erfolgte wie bei Abb. 8.

Die Anfangswerte bei dieser Art der Aufarbeitung lagen zwischen 20 und 40 µg je 10^6 Protoplasten. Auch bei bloßer Zentrifugation ist eine gewisse Verunreinigung cyto-

plasmatischer Natur nicht zu vermeiden. Sicher tragen auch einige nicht abgebaute Zellwandreste in geringem Umfang zu den Anfangswerten bei.
Insgesamt sind bei der eben beschriebenen Methode die Verunreinigungen geringer, dafür muß jedoch ein anderer Nachteil in Kauf genommen werden. Bei den geringen Mengen an Kohlenhydraten kann es bei der Präparation der Zellwände zu Schwankungen kommen, sodaß der zeitliche Verlauf der Regeneration nicht mehr korrekt erfaßt wird. Diese Schwankungen konnten durch die Verwendung von Ethanol bei der Präzipitation vermieden werden; auch bei der geringe Menge an Produkten im Glucansynthase-Test können auf diese Art gut reproduzierbare Werte erzielt werden.
Es ist auch nicht auszuschließen, daß ohne Zugabe von Ethanol bestimmte Teile der Zellwand bei der Präparation verloren gehen können; so ist der Anteil an Uronsäuren an den Gesamtkohlenhydraten in Abb. 15 niedriger als in Abb. 13.
Aus den geschilderten Gründen wurde deshalb die sichere Methode mit Ethanol als günstiger erachtet. Sollte jedoch die Anfangsphase der Regeneration untersucht werden, erscheint es besser, auf die Zugabe von Ethanol zu verzichten.

3.3. Nähere Charakterisierung der Zellwände und extrazellulären Polysaccharide von regenerierenden Protoplasten

Hier wurden die unter III.2.3. für Suspensionszellen beschriebenen Experimente mit regenerierenden Protoplasten durchgeführt.

3.3.1. Neutrale Monosaccharide der Zellwand

Abb. 16 zeigt die prozentuale Verteilung der neutralen Monosaccharide in der Zellwand der Protoplasten. Die Hydrolyse erfolgte mit 2 M TFA, sodaß Cellulose nicht oder nur zum Teil erfaßt wird. Bis auf den eher für Verunreinigungen als für die Zellwand typischen Anfangswert ändert sich die Zell-

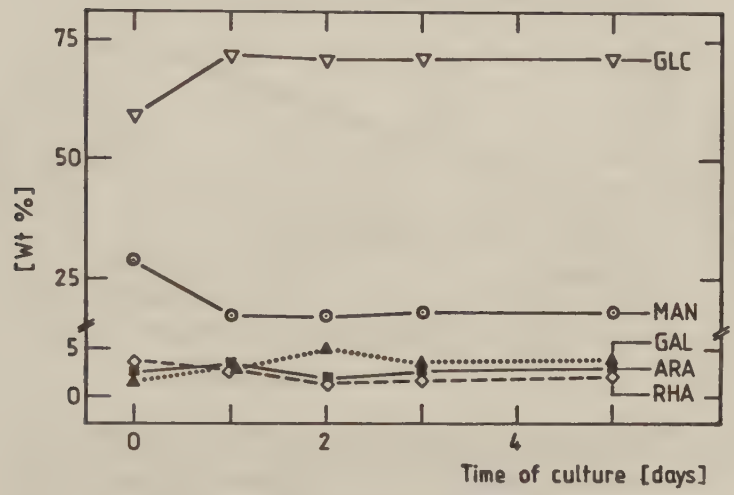


Abb. 16: Neutralzuckerzusammensetzung der Zellwand (außer Cellulose) von Protoplasten im Verlauf der Kultur. Abk. s. Abb. 10.

wand hinsichtlich der neutralen Zucker im Verlauf der Kultivierung nicht. Glucose nimmt auch ohne Hydrolyse der Cellulose mit etwa 71 % eindeutig die dominierende Position ein, gefolgt von Mannose mit 18 %, zusammen also 89 %. Die drei anderen identifizierten Zucker (Galactose, Arabinose und Rhamnose) spielen mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle, 2 % sind bislang nicht identifizierte Zucker oder Verunreinigungen.

Die nächste Abbildung (17) zeigt die gesamten Kohlenhydrate der Zellwand im Verlauf der Regeneration. Die Zellwände wurden für die beschriebene gaschromatographische Analyse benutzt.

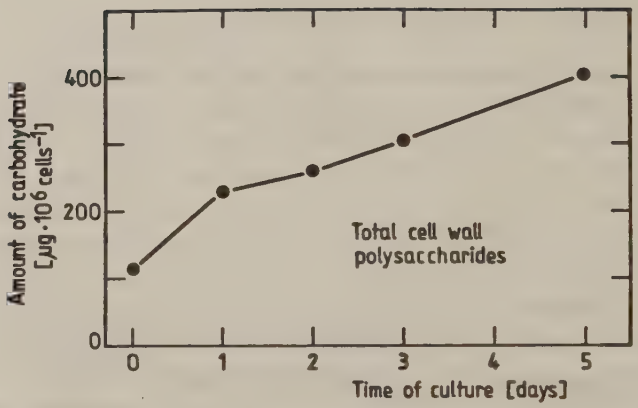


Abb. 17: Verlauf der Zellwandregeneration von Protoplasten. Das Gesamtkohlenhydrat wurde wie in Abb. 8 bestimmt. Diese Aufarbeitung wurde für die gaschromatographische Analyse der Zellwand (Abb. 16) benutzt.

3.3.2. Neutrale Monosaccharide der extrazellulären Polysaccharide

Die prozentualen Anteile der Zucker verändern sich im Verlauf der Kultivierung (Abb. 18); am Anfang sind wieder Glucose und Mannose vorherrschend, dann aber nehmen Arabinose und Galactose deutlich zu und umfassen etwa den gleichen Anteil wie Mannose. Rhamnose nimmt ebenfalls zu, bleibt aber unter 5 %. Die extrazellulären Polysaccharide weisen also eine größere Vielfalt im Aufbau auf. Dabei kann gegenwärtig nichts über spezifische Funktionen dieser Bausteine im Medium ausgesagt werden; denkbar ist genau so gut ein Unvermögen der Protoplasten, bestimmte Bausteine in die Zellwand einzufügen.

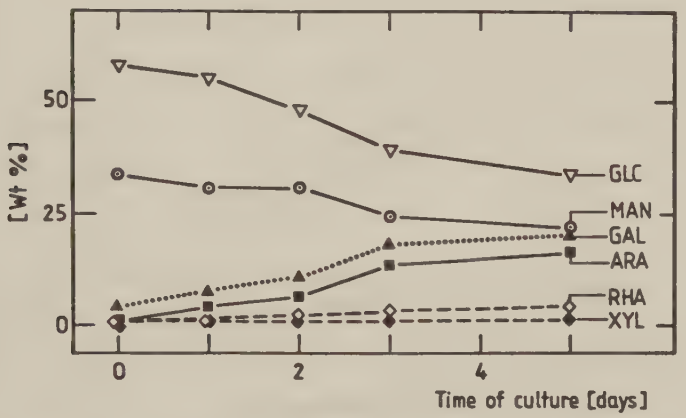


Abb. 18: Neutralzuckerzusammensetzung der extrazellulären Polysaccharide (außer Cellulose) von regenerierenden Protoplasten im Verlauf der Kultivierung. Abkürzungen s. Abb. 10.

3.3.3. Fraktionierung der Zellwand von regenerierenden Protoplasten

Pektine und Hemicellulosen nehmen im Verlauf der Kultivierung etwa gleiche Anteile ein (Abb. 19); diese Konstanz im zeitlichen Verlauf entpricht den gleichbleibenden Anteilen der neutralen Monosaccharide in Abb. 16. Der Beitrag der Cellulose ist mit etwa 10 % niedrig; dieses Ergebnis stimmt gut mit Werten überein, die mit der Methodik nach UPDEGRAFF (1969) gewonnen wurden (cf. Abb. 13).

3.4. Einfluß von DMSO auf die Bildung der Zellwand und extrazellulärer Polysaccharide im Verlauf der Kultivierung

HAHNE und HOFFMANN (1984) konnten bei Protoplasten von *Hibiscus*, die bis dahin bei einer Kultivierung keine

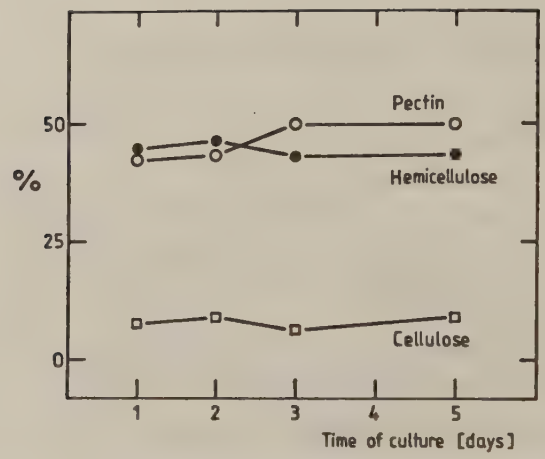


Abb. 19: Fraktionen der Zellwand im Verlauf der Kultivierung von Protoplasten. Die Kohlenhydrate wurden wie unter Abb. 12 angegeben bestimmt.

Teilung gezeigt hatten, durch Zugabe von DMSO die Bildung von Kalli anregen. Dabei wurde auch eine verstärkte Bildung von Zellwand-Material beobachtet. Die Autoren führten diese Effekte auf die Ausbildung eines Netzes corticaler Mikrotubuli zurück; bei Protoplasten von Tabak konnte die Hemmung der Teilung durch Colchicin mit der Zugabe von DMSO aufgehoben werden. Da Mikrotubuli bei der Bildung der Zellwand, insbesondere bei der Synthese von Cellulose, eine wichtige Rolle zugedacht wird (ROBINSON und QUADER, 1982), sollte überprüft werden, ob bei Protoplasten der Karotte eine Änderung der Zellwand-Regeneration festzustellen ist.
Abb. 20 zeigt die Bildung von Zellwand- und extrazellulären Polysacchariden. Mit DMSO ist die Bildung der ECP zunächst etwas erniedrigt, was der Zellwand zugute zu kommen scheint. Am vierten Tag aber liegen in beiden Fällen die Werte deutlich über der Kontrolle. Die Vitalität der Protoplasten war

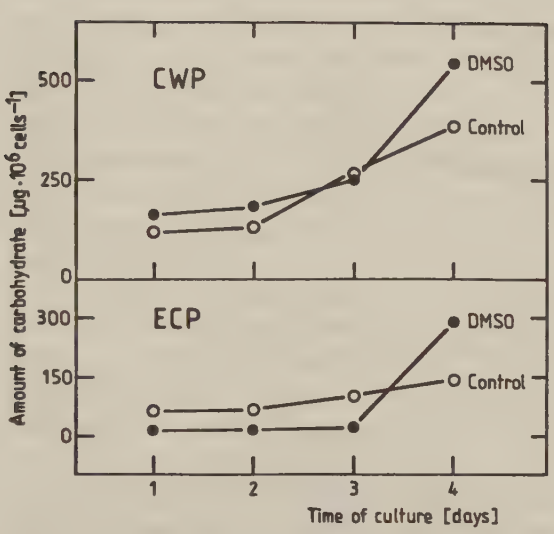


Abb. 20: Gesamtkohlenhydrat der Zellwand (CWP) und des Mediums (ECP) regenerierender Protoplasten mit (●–●) bzw. ohne (o–o) DMSO im Medium. Die Bestimmung des Gesamtkohlenhydrates erfolgte wie unter Abb. 8 angegeben.

in den ersten 3 Tagen der Kultivierung bei beiden Ansätzen gut (über 90 %). Am 4. Tag sank die Vitalität der regenerierenden Protoplasten mit DMSO im Medium auf 72 %; dabei war auch die absolute Zahl der Zellen niedriger. Lysierte Zellen könnten so zu den Änderungen der extrazellulären Polysaccharide beigetragen haben. Zellwand-Bruchstücke lysierter Zellen könnten auch bei der Aufarbeitung der Zellwand miterfaßt worden sein. Als Bezugsgröße gehen schließlich nur die nicht lysierten Zellen bei der Berechnung der Menge an Kohlenhydraten auf 10^6 Zellen ein.

Abb. 21 zeigt vergleichbare Werte für die Cellulose (säureunlösliches Material). Auch hier ist während der ersten 3 Tage keine wesentliche Änderung festzustellen. Der erhöhte Wert am 4. Tag der Kultivierung ist mit den eben gemachten

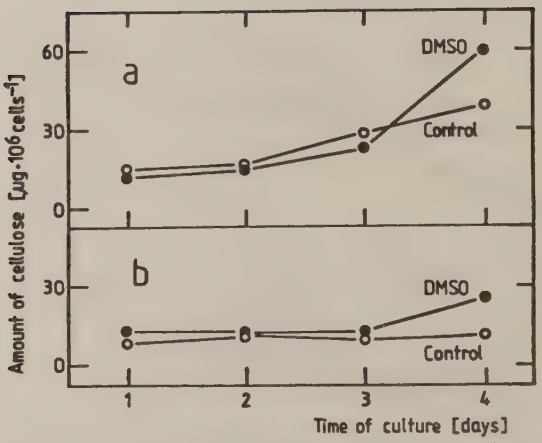


Abb. 21: Menge an Cellulose in der Zellwand (a) und im Medium (b) regenerierender Protoplasten mit (●–●) bzw. ohne (o–o) DMSO im Medium. Die Bestimmung der Cellulose erfolgte nach UPDEGRAFF (1969).

Einschränkungen zu betrachten.
Ein ähnlicher Verlauf wurde auch für das Auftreten von Uronsäuren in Polysacchariden im Verlauf der Kultivierung beobachtet; auch hier war in den ersten 3 Tagen kein deutlicher Effekt zu vermerken.

3.5. Hydroxyprolinhaltige Glycoproteine der Zellwand und des Kulturfiltrates

Extensin gilt als mengenmäßig bedeutsamstes Glycoprotein der Zellwand; sein Anteil daran wird mit ungefähr 1 – 10 % angegeben (DARVILL et al., 1980). Genaue Angaben sind oft schwierig, da zumindest ein großer Anteil des Extensins nur schwer oder nicht spezifisch aus der Zellwand herauszulösen ist. Der Proteinanteil des Extensins ist durch einen sehr

hohen Anteil der Aminosäure Hydroxyprolin gekennzeichnet; diese Eigenschaft kann zur indirekten Schätzung des Gehaltes an Extensin herangezogen werden (BRYSK und CHRISPEELS, 1972; FRY, 1983b), solange gewährleistet ist, daß keine anderen hydroxyprolinhaltigen (Glyco-) Proteine in nennenswertem Umfang vorhanden sind. In pflanzlichen Zellen ist Hydroxyprolin bisher nur in wenigen Glycoproteinen nachgewiesen worden; außer Extensin handelt es sich dabei um Arabinogalactan-Proteine und Lektine der Solanaceen (FINCHER et al., 1983). Arabinogalactan-Proteine sind leicht wasserlöslich und befinden sich bei Suspensionskulturen nach der Sekretion überwiegend im Medium (ANDERSON et al., 1977; AKIYAMA und KATO, 1981); sie können mit Yariv-Reagenzien präzipitiert werden (JERMYN und YEOW, 1975).
Tab. 9 zeigt den Hydroxyprolin-Gehalt in der Zellwand und im Medium einer 5 Tage alten Suspensionskultur. Wie beim Gesamtkohlenhydrat ist die überwiegende Menge in der Zellwand lokalisiert.

Tab. 9: Menge an Hydroxyprolin in der Zellwand und im Kulturfiltrat einer 5 d alten Kultur. Gereinigte Zellwände und gereinigtes Kulturfiltrat wurden mit HCl hydrolysiert und dann der Gehalt an Hydroxyprolin bestimmt.

Zellwand	Kulturfiltrat
18µg je g FG Zellen	3,3µg je g FG Zellen
0,73µg je 10^4 Zellen	0,14µg je 10^4 Zellen
---	0,4µg je ml Suspension

Analysiert man die Zellen direkt auf Hydroxyprolin, so ergibt sich ein Betrag von 23,6 µg pro Gramm Frischgewicht Parallel wurde eine Zellwand-Präparation durchgeführt; dabei fanden sich 6,5 µg in den Waschüberständen der Reinigungsschritte und 15 µg in der Zellwand (pro Gramm FG) in der Summe also etwa die Menge, die bei ganzen Zellen gemessen wurde.

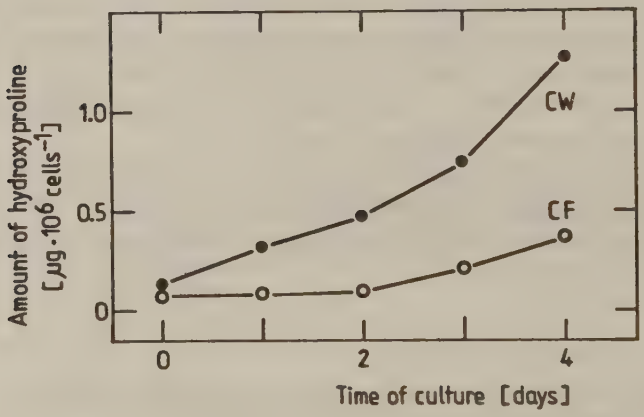


Abb. 22: Menge an Hydroxyprolin in der Zellwand (CW) und im Medium (CF) regenerierender Protoplasten. Zur Bestimmung wurden Proben des Experimentes der Abb. 13 benutzt.

Abb. 22 zeigt die Menge an Hydroxyprolin in der Zellwand und im Kulturfiltrat regenerierender Protoplasten. Erstaunlicherweise ist die Menge pro 10 ⁶ Zellen am 4. Tag höher als bei den Suspensionszellen, obwohl vergleichsweise weniger Polysaccharide in der Zellwand vorhanden sind.
Wie bei den Suspensionszellen liegt auch bei regenerierenden Protoplasten die Menge an Hydroxyprolin direkt hydrolysierter Zellen höher als die der Zellwand (Abb. 23).

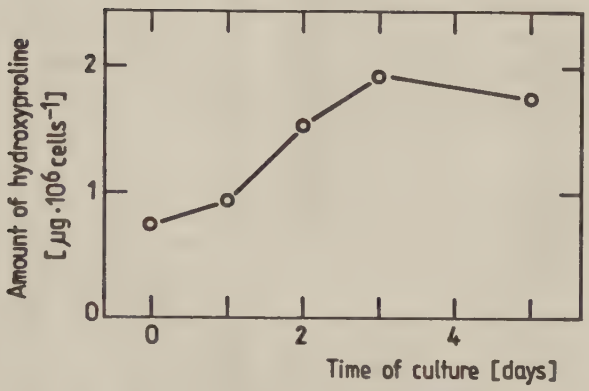


Abb. 23: Menge an Hydroxyprolin der gesamten Zellen im Verlauf der Kultivierung von Protoplasten. Zur Bestimmung wurden die gleichen Proben wie in Abb. 17 benutzt.

Bei den hydroxyprolinhaltigen Glycoproteinen des Mediums kann es sich sowohl um Arabinogalactan-Proteine als auch um "precursor"-Moleküle des Extensins handeln; Extensin wird vermutlich erst durch intermolekular gebildetes Isodityrosin in die Zellwand integriert und unlöslich (COOPER und VARNER, 1983b; 1984). Eine Unterscheidung kann durch Präzipitation mit Yariv-Reagenzien getroffen werden. Arabinogalactan-Proteine können damit ausgefällt werden.

Abb. 24 zeigt den Prozentsatz an Hydroxyprolin, der durch das ß-Galactosyl-Yariv-Reagenz aus dem Medium präzipitiert werden kann. Dabei wurde das Kulturfiltrat 7 Tage alter Suspensionszellen verwendet, da dieses regelmäßig beim Überimpfen anfällt; bei Protoplasten wurde das Medium von Zellen verwendet, die sich 5 Tage in Kultur befanden. Parallel wurde die Menge an Kohlenhydrat bestimmt, um unspezifische Sedimentation ausschließen zu können.

Aus dem Medium der Suspensionkultur läßt sich 70 % des Hydroxyprolins mit dem Yariv-Ragenz sedimentieren, aber nur

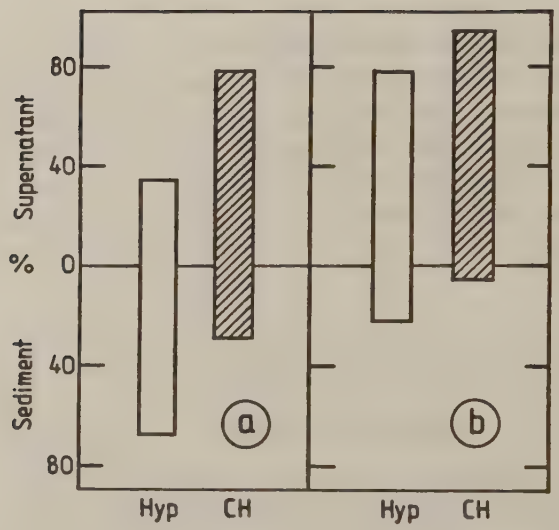


Abb. 24: Präzipitation von hydroxyprolinhaltigem Material aus dem Kulturfiltrat von Suspensionszellen (a) und regenerierenden Protoplasten (b) mit dem ß-Galactosyl-Yariv-Reagenz. Bei Suspensionszellen wurde das Medium 7 d alter Kulturen verwendet. Die Protoplasten befanden sich 5 d in Kultur. Die Regeneration der Zellwand ist in Abb. 17 gezeigt.
Kohlenhydrate wurden mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode bestimmt.
Hyp = Hydroxyprolin , CH = Kohlenhydrat.

30 % des Kohlenhydrats (Abb. 24a); dabei ist nicht berücksichtigt, daß auch das Reagenz Galactose enthält. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Menge an sedimentiertem Hydroxyprolin mit der eingesetzten Menge an Yariv-Reagenz zunimmt; es liegt also keine selektive Sedimentation von Hydroxyprolin im Vergleich zu den Polysacchariden vor.
Abb. 24b zeigt die Situation beim Medium regenerierender Protoplasten: Nur ein kleiner Prozentsatz des Hydroxyprolins

läßt sich mit dem Yariv-Reagenz ausfällen. Nahezu 80 % bleiben im Überstand; möglicherweise handelt es sich dabei hauptsächlich um "precursor"-Moleküle des Extensins, die nicht in die Zellwand integriert worden sind.

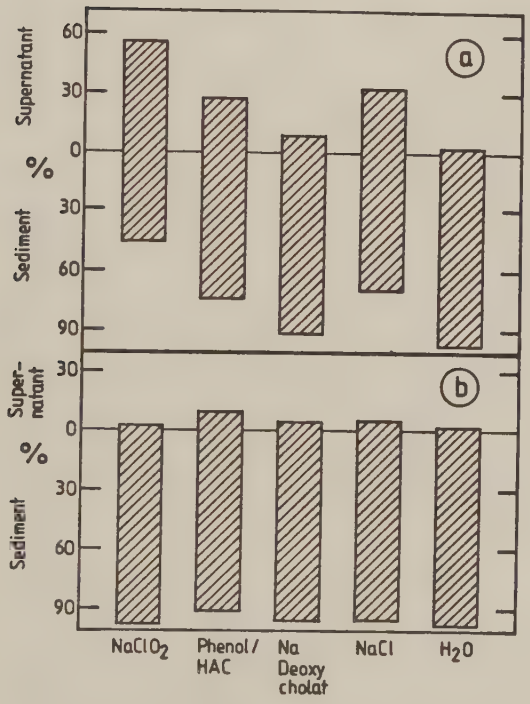


Abb. 25: Extraktion von Hydroxyprolin (a) und Kohlenhydrat (b) aus der Zellwand 5 d alter Suspensionszellen mit verschiedenen Agenzien. Die Extraktion erfolgte mit NaCl über 12 h bei 4 °C, sonst über 4 h bei 70 °C. Nach der Extraktion wurden die Proben zentrifugiert, die Überstände 12 h dialysiert. Kohlenhydrate wurden mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test bestimmt.

Zum Schluß dieses Abschnittes sollen noch Experimente zu den hydroxyprolinhaltigen Glycoproteinen der Zellwand geschildert werden. Dabei konnte aufgrund vieler Ergebnisse an verschiedenen Objekten, darunter als wichtigstem die Karotte, davon ausgegangen werden, daß es sich um Extensin oder "precursor"-Moleküle des Extensins handelt.
Abb. 25a zeigt zusammenfassend Experimente, bei denen untersucht wurde, wie leicht Hydroxyprolin aus der Zellwand herauszulösen ist.
"Precursor"-Moleküle des Extensins lassen sich mit NaCl (oder $CaCl_2$) einfach eluieren und sind somit für strukturelle Untersuchungen leichter zugänglich (COOPER und VARNER, 1983b). Dieser Anteil beträgt hier etwa 30 %. Bereits verknüpftes Extensin läßt sich durch Lösen der Diphenyletherbrücken mit $NaClO_2$/HAc wieder solubilisieren (O'NEILL und SELVENDRAN, 1980); dabei werden glycosidische Bindungen nicht angegriffen. Nach 4 h bei 70 °C betrifft dies mehr als die Hälfte des Hydroxyprolins. Mit Wasser oder Detergens (Natriumdeoxycholat) zeigt sich kein Effekt, sodaß lösliche Arabinogalactan-Proteine ausgeschlossen werden können. Phenol/Essigsäure zeigt ein dem NaCl vergleichbare Wirkung. In allen Fällen wirken die angewendeten Reagenzien nicht auf den Kohlenhydrat-Anteil (Abb. 25b), sodaß von einer selektiven Extraktion hydroxyprolinhaltigen Materials ausgegangen werden kann.

B) Trennung von Membranen aus Protoplasten und Suspensionszellen von *Daucus carota*

Die Bausteine der Zellwand werden an verschiedenen Membrankompartimenten der pflanzlichen Zelle synthetisiert. Der Syntheseort für Cellulose ist, von Ausnahmen abgesehen, die Plasmamembran; dies konnte mit elektronenmikroskopischen Techniken nachgewiesen werden. Die Komponenten der Hemicellulosen und Pektine werden im Golgi-Apparat gebildet (NORTHCOTE, 1979; ROBINSON, 1976). Dies konnte mit "pulse-chase"-Experimenten und Zellfraktionierung gezeigt werden (RAY et al., 1976; ROBINSON et al., 1976). Die Synthese von Callose findet am Plasmalemma statt; an der Regulation der Enzymaktivität ist Ca^{2+} beteiligt (KAUSS, 1985). Der Proteinanteil der Glycoproteine (z.B. Extensin, Arabinogalactan-Proteine) wird am ER gebildet. Unklarheit besteht hier noch bei der Lokalisierung der Hydroxylierung des Prolins bei den angeführten Beispielen; sowohl das ER als auch der Golgi-Apparat werden genannt (SAUER und ROBINSON, 1985; COHEN et al., 1983). Möglicherweise gibt es Unterschiede bezüglich Extensin und Arabinogalactan-Proteinen. Es wird angestrebt, mit Antikörpern, gewonnen mit Hilfe gereinigter Prolyl Hydroxylase (BLANKENSTEIN et al., 1986), die Lokalisierung zu bestätigen (ANDREAE et al., 1986). Nicht zweifelsfrei lokalisiert ist auch der Ort der Anheftung von Arabinose-Seitenketten an Hydroxyprolin (ROBINSON et al., 1985; ANDREAE et al., 1986).
Die Enzyme des Golgi-Apparates, die an der Synthese der Wandkomponenten beteiligt sind, und ihr Zusammenwirken bei der Bildung komplexer Polysaccharide sind unzureichend bekannt (WALDRON und BRETT, 1985). Neben Glucansynthasen sind auch Arabinansynthase(n) (ODZUK und KAUSS, 1972; BOLWELL und NORTHCOTE, 1984) und Xylansynthase(n) (BOLWELL und NORTHCOTE, 1983), ebenso Polygalacturonsäuresynthase (BOLWELL et al., 1985a) und die kooperative Wirkung von Glucansynthase und UDP-Xylose Xylosyltransferase (RAY, 1980a) beschrieben

worden. Die Produkte sind jedoch nur vorläufig bestimmten Komponenten der Zellwand zugeordnet. Erschwert wird die Analyse enzymatischer Aktivitäten durch die Vielzahl von Enzymen des Golgi-Apparates, die Nukleotid-Zucker als Substrat benutzen; dabei sind die Glycosidierung und das "processing" intrazellulärer Glycoproteine weitere Erschwernisse.
Die Solubilisierung und Reinigung der einzelnen Enzyme könnte einen gezielten Einsatz bei *in vitro*-Testansätzen mit anschließender Analyse der gebildeten Produkte ermöglichen (WALDRON und BRETT, 1985). Reine Membranfraktionen könnten das Erreichen dieser Zielsetzung erleichtern. In den letzten Jahren sind neue Ansätze zur Membrantrennung entwickelt worden, die die konventionellen Techniken der Reinigung (isopyknische und/oder "rate-zonal" Zentrifugation) ergänzen oder verbessern könnten. Vor allem die Trennung mit einem Zweiphasensystem aus PEG und Dextran (WIDELL et al., 1982; UEMURA und YOSHIDA, 1983; LARSSON, 1985) hat eine weite Verbreitung gefunden. Darüber hinaus sind bei Protoplasten neue Ansätze erprobt worden, die das Anheften bestimmter Substanzen an das Plasmalemma beinhalten (SCHIBECI et al., 1982; SCHMIDT et al., 1983; GIRARD und FEVRE, 1984). Protoplasten haben den Vorteil, daß das Fehlen der Zellwand ein schonenderes Verfahren bei der Homogenisierung und damit eine Isolierung mit einem höheren Prozentsatz intakter Organellen ermöglicht (NAGAHASHI, 1985). So setzen z.B. intakte Vakuolen keine hydrolytischen Enzyme frei.
Möglicherweise haben Protoplasten auch eine veränderte Ausstattung an Enzymen; die einfachere Zusammensetzung der gebildeten Zellwand im Vergleich mit den Suspensionszellen legt diesen Schluß zumindest bei der Zellinie DC_{B1} nahe. Das Auftreten von Glucose und Mannose als überwiegende Bestandteile könnte die Suche nach Enzymen, die an der Synthese an einem (noch zu identifizierenden) Glucomannan beteiligt sind, erleichtern.

1. Trennung der Membranen über lineare Gradienten

Lineare Saccharose-Gradienten werden sehr häufig zur Trennung von Membranen benützt, und zwar meist in Kombination mit einer differentiellen Zentrifugation, die dazu dient, Kerne, Zellwände, Mitochondrien oder nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Die Membran-Fraktionen werden mit Hilfe von "Markern" identifiziert, meistens Leitenzyme (QUAIL, 1979). Nicht alle diese "Marker" sind in ihrer Spezifität allgemein akzeptiert, da sich die Verteilungsmuster breit überlagern. Dies kann auf die unzureichende Trennung der Membranen zurückzuführen sein, aber ebensogut können Enzymaktivitäten auf mehrere durch den Membranfluß in Zusammenhang stehende Kompartimente verteilt sein. So findet sich ATPase-Aktivität am Plasmalemma (HODGES und LEONHARD, 1974), am Golgi-Apparat (CHANSON et al., 1984) und am Tonoplast (CHURCHILL und SZE, 1983; O'NEILL et al., 1983). Diese Aktivitäten unterscheiden sich allerdings in der Hemmung und Stimulierung durch verschiedene Ionen und andere Agenzien (HAGER und BIBER, 1984). Im folgenden wurden deshalb für die Lokalisierung des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas meistens mehrere Leitenzyme herangezogen.
Abb. 26 zeigt die Verteilung von GT I G und GT II U in einem linearen Gradienten von 15 - 45 % Saccharose. Protoplasten wurden zweimal in PI-3 und dreimal in PI-3B gewaschen. Das Lysemedium enthielt zusätzlich 5 mM EGTA. Nach der Lyse wurde 5 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand auf 12 % Saccharose eingestellt und auf den Gradienten aufgetragen. Das Gradientenmedium enthielt weder $MgSO_4$ noch DTT, die Zentrifugationsdauer war 3 h.
Es ergab sich keine Trennung der Aktivitäten, die dem Golgi-Apparat (GT I G) und dem Plasmalemma (GT II U) zugeordnet werden. Die maximale Aktivität der IDPase fand sich ebenfalls in diesem Bereich des Gradienten, ATPase war unter diesen Bedingungen nicht meßbar. Normalerweise finden sich die Maxima für die Leitenzyme des Plasmalemmas bei einer Saccharose-Konzentration von 36 - 40 % (w/w). Für die unübliche Verteilung im vorliegenden Fall waren mehrere Erklä-

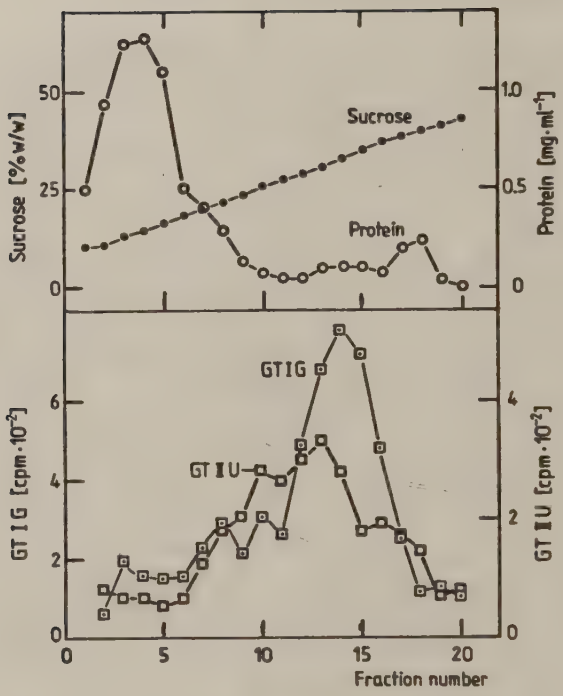


Abb. 26: Verteilung von Glucosyltransferase I und II in einem linearen Gradienten von 15 – 45 % (w/w) Saccharose. Protoplasten wurden in Lysemedium mit 5 mM EGTA aufgeschlossen, der 1000 g-Überstand auf den Gradienten gegeben. Die Laufzeit betrug 3 h.

rungen denkbar:

- EGTA im Lysemedium hemmt die Aktivitäten der GT II U und der ATPase des PLasmalemmas, sodaß sie im Gradienten nicht aufgefunden werden. Es ist bekannt, daß EDTA die GT II U z.T. irreversibel hemmt (INGOLD, 1982).
- Das angewendete Trennsystem ist in der Zusammensetzung von Puffer und Ionen nicht geeignet.

- Die Zentrifugationsdauer ist zu kurz.
- Die zellwandabbauenden Enzyme enthalten Proteasen, die die Proteine des Plasmalemmas schädigen, sodaß sich die Dichte der Plasmamembran zu niedrigeren Werten verschiebt.
- Bei der Isolierung der Protoplasten in hypertonischem Medium wird selektiv lipidhaltiges Material in das Plasmalemma integriert, sodaß sich die Dichte aufgrund der veränderten Zusammensetzung zu kleineren Werten verschiebt.
- Verschiedene Konzentrationen an Mg^{2+} können nicht nur einen "shift" des ER, sondern auch der Plasmamembran hervorrufen (ROBINSON et al., 1982).

Zunächst wurden die Eigenschaften des Trennsystems mit Membranen aus Suspensionszellen untersucht. Abb. 27 zeigt die Verteilung der Leitenzyme im linearen Gradienten. Das Lysemedium enthielt bei dieser Aufarbeitung kein EGTA, sondern 1 mM DTT, ebenso das Gradientenmedium. Die Leitenzyme des Plasmalemmas und des Golgi-Apparates sind aufgetrennt und unterscheiden sich in ihren Maxima um vier Fraktionen. GT II U zeigt dabei ein weiteres Maximum im Bereich der Membranen des Golgi-Apparates, ein Phänomen, das häufig auftritt; vermutlich handelt es sich bei dieser Aktivität um Glucansynthase I, die auch bei veränderten Testbedingungen arbeitet; darauf deuten zumindest die Analysen der Bindungstypen beider Glucansynthasen (QUENTMEIER, persönliche Mitteilung). Die Bereiche des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas überlappen sich; diese Beobachtung wird oft bei Aufarbeitungen aus dikotylen Pflanzen beobachtet (ROBINSON, 1985); das Verhältnis der beiden Maxima kann stark schwanken. Dieses erste Maximum tritt bei der Steroyl-Glucosyltransferase nicht auf. ER (CCR) und Mitochondrien (CCO) sind von den anderen Membranfraktionen deutlich getrennt. Die Dichte des Plasmalemmas entspricht der von 37 % Saccharose, ein Wert, der etwas niedriger liegt als der von INGOLD (1985) ermittelte .

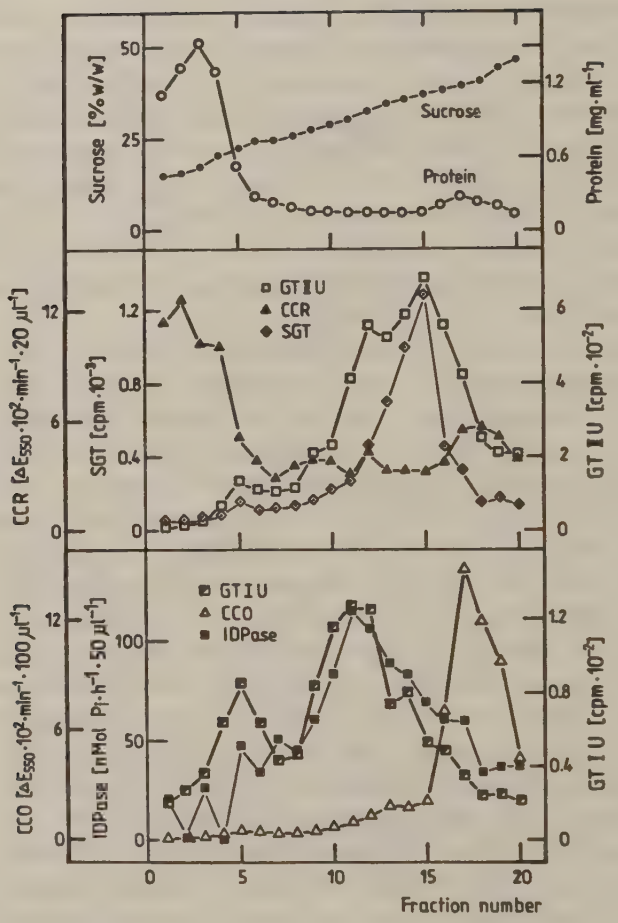


Abb. 27: Verteilung von Enzymaktivitäten in einem linearen Gradienten von 20 – 45 % (w/w) Saccharose. 5 Tage alte Suspensionszellen wurden homogenisiert und der 1000 g-Überstand auf den Gradienten aufgetragen. Das Gradientenmedium enthielt 3 mM $MgSO_4$. Laufzeit: 3 h.

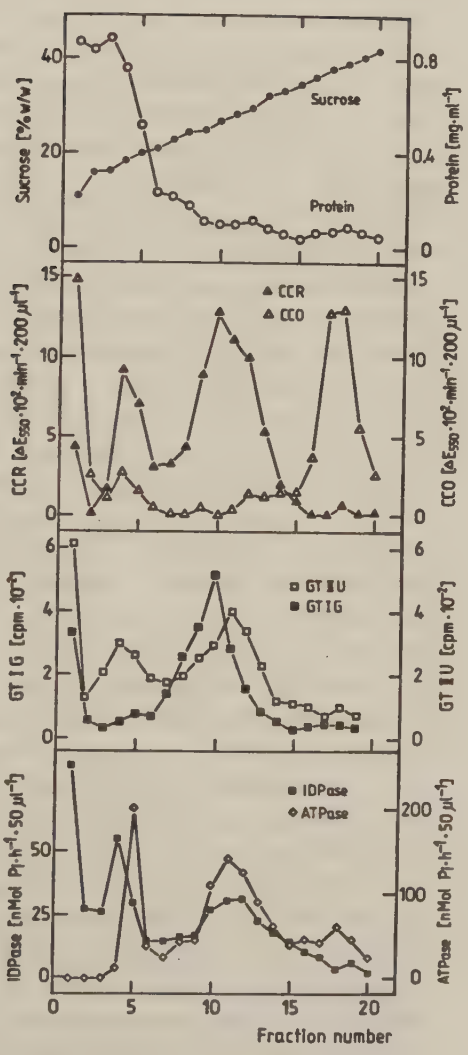


Abb. 28:

Verteilung von Enzymaktivitäten in einem linearen Gradienten von 20 - 45 % (w/w) Saccharose.
Die Protoplasten wurden durch Langzeitisolierung hergestellt.
Der 1000 g-Überstand des Lysates wurde auf den Gradienten aufgetragen. Das Gradientenmedium enthielt 3 mM $MgSO_4$.
Laufdauer: 3 h.

Es wurde nun bei Protoplasten versucht, den Einfluß verschiedener Parameter auf die Verteilung der GT II U im linearen Gradienten zu ermitteln.
Zunächst wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen an Mg^{2+}-Ionen (0,1 - 3 mM) im Gradientenmedium beobachtet; bei allen weiteren Versuchen dieses Abschnittes wurde auf die Verwendung von EGTA im Lysemedium verzichtet.
Abb. 28 zeigt ein Experiment mit 3 mM $MgSO_4$ im Gradientenmedium. Alle Maxima der Leitenzyme des Plasmalemmas und des Golgi-Apparates liegen unter 30 % (w/w) Saccharose und sind nicht voneinander getrennt.
Im nächsten Versuch wurde die Zentrifugationsdauer auf 15 h erhöht; das Gradientenmedium enthielt 0,1 mM $MgSO_4$ (Abb. 29). Beide Leitenzyme des Golgi-Apparates, GT I G und IDPase, haben ihre "peaks" unterhalb 30 % (w/w), die Gipfel sind um eine Fraktion verschoben. Die Proteinmaxima treten bei dieser Zentrifugationsdauer deutlicher zu Tage, wobei im Gradienten drei Gipfel zu erkennen sind. Das Maximum der GT II U ist im Vergleich zu den Leitenzymen des Golgi-Apparates 2 - 3 Fraktionen verschoben und liegt bei lediglich 30 % (w/w) Saccharose, wobei bei 33 % eine deutliche Schulter auftritt.
Parallel zu diesem Ansatz wurde untersucht, wie sich die Proteasen der zellwandabbauenden Enzyme auf die Lokalisierung der GT II U auswirken. Das Isolierungsmedium für die Protoplasten wurde vor der Benutzung 10 min bei 50 °C (pH 6,5) inkubiert; dies reduziert die proteolytische Aktivität der Cellulase Onozuka R10 auf etwa 4 %, ohne daß die zellwandabbauende Wirkung beeinträchtig wird (VAN DER VALK, 1984). Diese Behandlung hat keinen deutlichen Einfluß auf die Verteilung der Glucansynthase II, das Maximum bleibt bei 30 %, die Schulter bei 33 % (w/w) Saccharose (Abb. 30). Möglicherweise ist diese Verteilung der bei beiden Experimenten angewendeten Kurzzeitisolierung der Protoplasten zuzuschreiben. Durch die Reduzierung der Protease-Aktivität wurde die GT II U etwas deutlicher ausgeprägt.

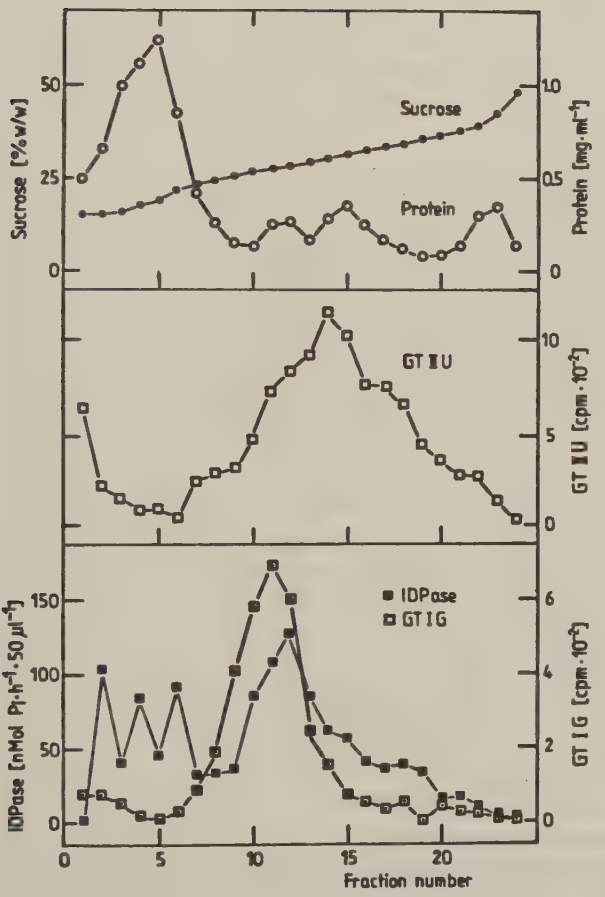


Abb. 29: Verteilung von Enzymaktivitäten in einem linearen Saccharose-Gradienten von 20 - 38 % (w/w) mit einem Kissen von 2 ml 50 %iger (w/w) Saccharose. Das Gradientenmedium enthielt 0,1 mM $MgSO_4$. Protoplasten wurden durch Kurzzeitisolierung hergestellt. Der 1000 g-Überstand wurde auf den Gradienten aufgetragen. Die Laufzeit betrug 15 h.

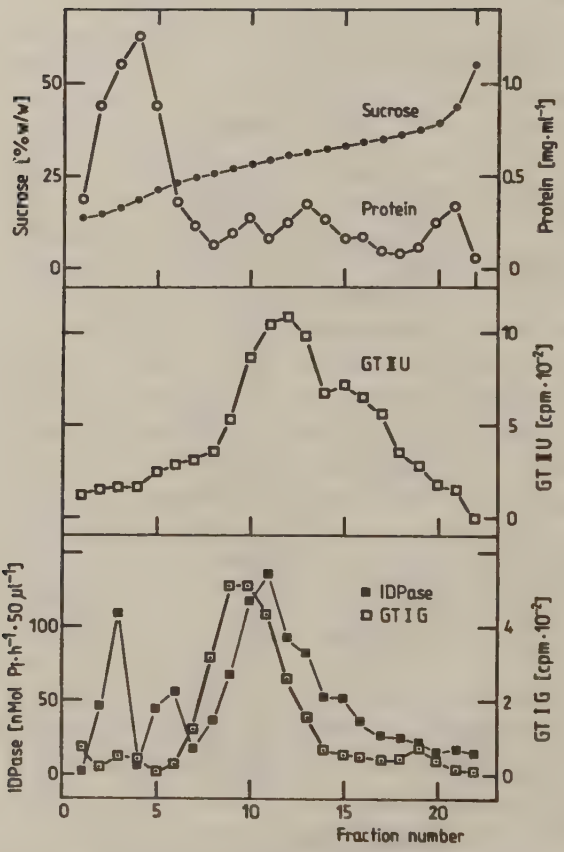


Abb. 30: Verteilung von Enzymaktivitäten in einem linearen Saccharose-Gradienten. Die Enzymlösung für die Herstellung der Protoplasten wurde 10 min bei 50°C inkubiert. Die weiteren Bedingungen entsprechen Abb. 29.

Es blieb die Frage, ob die Glucansynthase-Aktivität überwiegend dem Golgi-Apparat zuzurechnen ist, d.h. ob überhaupt sehr wenig Aktivität am Plasmalemma vorhanden ist, oder ob das Plasmalemma bei Protoplasten eine niedrigere Dichte hat als bei Suspensionszellen.

Welchen Einfluß das Gradientenmedium bzw. das Lysemedium auf das Verteilungsmuster der Leitenzyme hat, zeigt die folgende Abbildung 31. Saccharose wurde hier durch Metrizamid ersetzt. Das Lysemedium enthielt 8 % (w/v) Metrizamid und 1 mM DTT neben der üblichen Konzentration an HEPES und KCl, der Gradient verlief von 10 - 40 % (w/v) Metrizamid. Der 1000 g-Überstand des Lysates wurde auf den Gradienten aufgetragen. Das Gradientenmedium enthielt ebenfalls 1 mM DTT sowie HEPES und KCl in der gewohnten Molarität; die Zentrifugationsdauer betrug 14 h.
Dichte-Gradienten aus iodierten Substanzen wie Metrizamid oder Urografin (Renografin) werden ebenfalls zur Trennung von Membranen oder Organellen eingesetzt (BOSS und RUESINK, 1979; TAIZ et al., 1983; HOPP et al., 1985), haben aber keine so weite Verbreitung wie Saccharose-Gradienten gefunden: Zum einen, weil die Substanzen teurer sind, zum anderen, weil sie mit gängigen Testverfahren interferieren, so z.B. bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) oder mit der Bestimmung von Phosphat. Die Gradientenfraktionen müssen also erst sedimentiert und mit einem geeigneten Medium gewaschen werden, um diese Substanzen zu entfernen. Ihr Vorteil liegt jedoch in der geringen Viskosität bei vergleichbarer Dichte; weiter sind sie osmotisch weniger aktiv als z.B. Saccharose.
Nach der Zentrifugation und Fraktionierung des Gradienten wurden die Aktivitäten von CCR und CCO gemessen und der Brechungsindex mit einem Refraktometer bestimmt. Danach wurden die Fraktionen mit Waschmedium (150 mM Saccharose, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 8) verdünnt und sedimentiert (40000 g, 1 h).

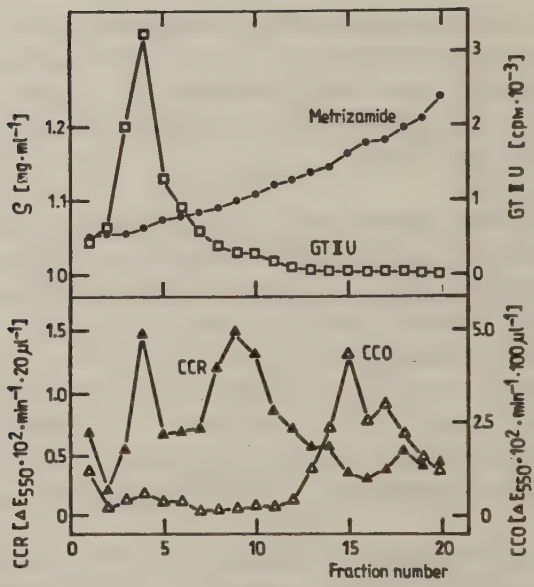


Abb. 31: Verteilung von Enzymaktivitäten in einem linearen Metrizamid-Gradienten von 10 - 40 % (w/v). Protoplasten wurden durch Kurzzeitisolierung hergestellt und in einem Lysemedium aufgeschlossen, das 8 % Metrizamid und 1 mM DTT enthielt. Das Gradientenmedium enthielt 1 mM DTT und 0,1 mM $MgSO_4$. Die Laufdauer betrug 14 h. Vor der Messung der GT II U wurden die Fraktionen sedimentiert und gewaschen.

Das Sediment wurde im Waschmedium resuspendiert, dann erneut zentrifugiert und jeweils in einem Milliliter Waschmedium resuspendiert. Mit diesen Proben wurde dann der Glucansynthase-Test durchgeführt.

Während CCO und CCR eine normale Verteilung zeigen, verhält sich die GT II U sehr ungewöhnlich: ihr Maximum liegt am Anfang des Gradienten bei einer Dichte von 1,064 $g*ml^{-1}$. Es handelt sich dabei nicht um eine solubilisierte oder lösliche Form, da die Fraktionen des Gradienten vor dem Test

sedimentiert wurden. Eine vergleichbare Verteilung für einen Marker des Plasmalemmas nach Auftrennung in Metrizamid-Gradienten findet sich auch bei *Cucurbita* (DE LUCA et al., 1984).

Da Metrizamid sehr teuer ist, wurden weitere Experimente mit Urografin durchgeführt. Urografin ist das Megluminsalz der Amidotrizoesäure und im Gegensatz zu Metrizamid ionisch. Bei der Zentrifugation flockte im Gradienten DNA aus, vermutlich aufgrund der hohen Ionenstärke (GROSS, persönliche Mitteilung). Durch Zugabe von DNAse während der Lyse konnte dies stark vermindert werden. Wenn im Gradienten zweiwertige Ionen vorhanden waren (3 mM $MgSO_4$), traten keine Schlieren oder Verklumpungen mehr auf. Die Leitenzyme glichen in ihrer Verteilung dem Metrizamid-Gradienten. Das Leitenzym für das Plasmalemma, in diesem Fall die Steroyl-Glucosyltransferase, hatte die maximale Aktivität am Beginn des Gradienten. Die Glucansynthase II war nach der Zentrifugation kaum mehr zu messen, obwohl auch hier die Fraktionen mit Saccharose-Lösungen gewaschen wurden. Die GT II U konnte auch durch Zugabe von BSA (2mg/ml) zu den Medien nicht geschützt werden.

2. Trennung von Membranen mit Hilfe von "microbeads"

Neben den gängigen Methoden mit Hilfe von linearen oder gestuften Gradienten aus Saccharose oder anderen Medien wurden in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Verfahren zur Trennung von Membranen erprobt. Einen festen Platz nimmt mittlerweile die Zweiphasen-Technik ("phase-partition") ein; die Membranen werden dabei nach ihren Oberflächen-Eigenschaften in einem System aus PEG 3350 und Dextran T 500 getrennt (ALBERTSSON, 1971). Dabei müssen die optimalen Konzentrationen der Polymere und an Ionen ermittelt werden, sodaß man nach der Zugabe von mikrosomalem Material eine Trennung in zwei Phasen erhält, wobei die obere Phase bevorzugt Plasmamembran enthält. Die obere Phase wird dann abgenommen und die Prozedur kann nochmals mit frischer Unterphase wie-

derholt werden, um die Reinheit der Plasmamembran zu verbessern (WIDELL et al., 1982; LARSSON, 1985; HODGES und MILLS, 1986).

Ein anderer Ansatz bietet sich bei der Arbeit mit Protoplasten an. Das Plasmalemma ist zum einen zugänglich für externe Markierungen. Dabei kann es sich um radioaktiv markiertes Concanavalin A (BOSS und RUESINK, 1979), um das Diazoniumsalz radioaktiver Sulfanilsäure (GALBRAITH und NORTHCOTE, 1977; CHADWICK und NORTHCOTE, 1980; PERLIN und SPANSWICK, 1980) oder um Iodierung von exponierten Tyrosin-Resten (SCHIBECI et al., 1982) handeln.

Zum anderen kann die Dichte oder Größe der Vesikel oder "sheets", die bei der Lyse entstehen, gezielt verändert werden. Bei Protoplasten von *Saprolegnia* wurde dafür Concanavalin A benutzt (GIRARD und FEVRE, 1984). SCHIBECI et al. verwendeten das Myelomaprotein J539, um eine reine Plasmamembran-Präparation aus Protoplasten von *Lolium multiflorum* zu erhalten; dieses Protein bindet an Galactose-Reste kohlenhydrathaltiger Komponenten der Plasmamembran.

In die gleiche Richtung zielt die Methodik mit positiv geladenen "microbeads", die von der Arbeitsgruppe um Bruce S. Jacobson entwickelt wurde. Die positiv geladenen "microbeads" haften an negative Oberflächenladungen des Plasmalemmas und werden untereinander durch ein Polyanion quervernetzt, sodaß ein stabiles Gerüst entsteht. Je nach Menge an "microbeads" können auch mehrere Schichten um das Plasmalemma gebildet werden (CHANEY und JACOBSON, 1983). Die "microbeads" haben einen Durchmesser von 10 - 50 nm und eine Dichte von 2,5 g/ml. Diese Dichte erlaubt eine Abtrennung der Plasmamembran von den anderen Organellen und Membranen durch einfache Zentrifugationsschritte. Im Gegensatz zur Methode mit dem Myelomaprotein J539 ist keine spezifische Komponente des Plasmalemmas erforderlich.

Für die weitere Arbeit wurden von Dr. Jacobson freundlicherweise Präparationen dieser "microbeads" zur Verfügung gestellt.

Es sollte geprüft werden, ob sich diese Methodik bei Protoplasten von *Daucus* benutzen läßt. Als Kriterien wurden angewendet:

- Verteilung der Leitenzyme verschiedener Membranen und Organellen bei differentiellen Zentrifugationsschritten.
- Unabhängig von biochemischen "Markern" sollte die Verteilung von radioaktivem Concanavalin A als externem "label" bei differentieller Zentrifugation untersucht werden.
- Muster von Leitenzymen im linearen Gradienten nach Abtrennung des Plasmalemmas mit "microbeads" im Vergleich zu unbehandelten Protoplasten.

2.1. Optimieren der Bedingungen für das Anheften der "microbeads" an Protoplasten

Ausgangspunkt waren die Bedingungen, wie sie für Protoplasten von *Saccharomyces* (SCHMIDT et al., 1983) und *Dictyostelium* (CHANEY und JACOBSON, 1983) angegeben wurden. So wurde das Anheften der "microbeads" an die Protoplasten ("Coating") und die Neutralisation mit Polyacrylsäure zunächst mit Acetatpuffer (30 mM, pH 5), 0,5 M Sorbit und 100 mM KCl durchgeführt; dies erwies sich als schädlich für die Vitalität der Protoplasten. An Stelle von Acetat- wurde deshalb MES-TRIS-Puffer (30 mM, pH 5) verwendet (später PI-3B und PI-3). Die Art und Weise, auf die die "microbeads" angeheftet und quervernetzt bzw. überschüssige Ladungen neutralisiert werden, mußte ebenfalls geändert werden. Ursprünglich wurde nach Zugabe von "microbeads" zentrifugiert, das Sediment gewaschen und erst dann PAS zur Neutralisation überschüssiger Ladungen zugegeben. Auf diese Weise entstanden starke Verklumpungen der Protoplasten. Deshalb wurden in weiteren Experimenten beide Schritte durchgeführt, bevor eine Zentrifugation erfolgte; es mußte darauf geachtet werden, daß die Protoplasten nicht sedimentierten, bevor nicht die gesamte PAS zugegeben worden war. Es war auch wichtig, das Anheften der "microbeads" in einem genügend

großen Volumen an Puffer durchzuführen.

2.2. Einfluß der Menge an "microbeads" und Polyacrylsäure auf das Verteilungsmuster von Leitenzymen bei einfacher Zentrifugation des Lysates

Zunächst wurde die geeignete Menge an "microbeads" ermittelt; es sollte eine unterschiedliche Verteilung der Leitenzyme des Plasmalemmas und des ERs bei einfacher Zentrifugation des Lysates auftreten. Abb. 32 zeigt die Aktivitäten

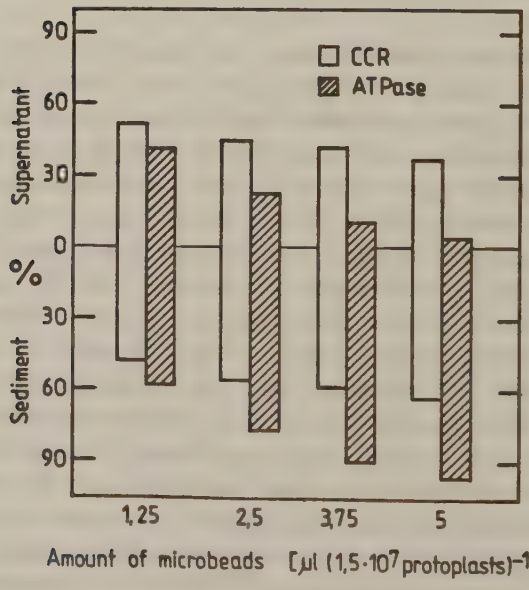


Abb. 32: Einfluß der Menge an "microbeads" auf das Sedimentationsverhalten von ATPase und CCR. Protoplasten wurden mit MES-TRIS-Puffer gereinigt und mit "microbeads" behaftet". Die Menge an PAS-Lösung betrug 100 µl je 10^7 Protoplasten. Die Lyse erfolgte mit 50 mM TRIS und 5 mM EGTA (pH 8). Nach 45 min wurde das Lysat 5 min bei 100 g zentrifugiert, das Sediment in Lysemedium resuspendiert.

von ATPase und CCR im Sediment und Überstand nach der Zentrifugation des Lysates bei 1000 g für 5 min. Es wird deutlich, daß bei steigender Menge an "microbeads" prozentual immer mehr ATPase im Sediment ist; auch die CCR nimmt prozentual zu, der Unterschied zur ATPase wird aber größer.
Die Zunahme an CCR im Sediment deutete auf eine steigende Aggregation von Membranen; deshalb wurde im nächsten Versuch die Menge an Polyacrylsäure bei der Neutralisation erhöht. Die Menge an "microbeads" wurde für die weiteren Versuche meist mit 5 µl je $1{,}5 * 10^7$ Protoplasten gewählt. Eine größere Menge brachte auch bei optimierter Neutralisation überschüssiger Ladungen mit PAS keine weitere Verbesserung, sondern führte zu Verklumpungen von Protoplasten beim Zentrifugieren; dabei konnten dann schon vor der Lyse Protoplasten zerstört werden und die Membranen oder Proteine mit nicht ausgewaschener PAS oder "microbeads" zu Aggregaten zusammenbacken.
Abb. 33 zeigt den Einfluß der Menge an PAS auf die Verteilung der Aktivitäten der ATPase und der CCR. Das Anheften der "microbeads" und die Neutralisation mit PAS erfolgte in MES-TRIS-Puffer (30 mM, pH 5 mit 0,5 M Sorbit und 100 mM KCl) ebenso wie die anschließenden Reinigungschritte. Die Lyse erfolgte mit 50 mM TRIS und 5 mM EGTA (pH 8). Nach der Zentrifugation des Lysates (1000 g, 5 min) wurde das Sediment in Lysemedium resuspendiert.
Es zeigte sich, daß eine bestimmte Menge an Polyacrylsäure notwendig ist, um eine unterschiedliche Verteilung der beiden Leitenzyme zu erzielen, d.h. ohne Zugabe von genügend PAS sind die "microbeads" nicht wirksam oder es kommt wie in Abb. 32 aufgrund nicht neutralisierter Ladungen zur Aggregation von Membranen bei der Lyse.
Weitere Experimente zeigten, daß die Menge an PAS nochmals erhöht werden mußte, um in allen Fällen solche Probleme zu vermeiden. Die Menge betrug in den folgenden Experimenten 400 µl einer 5 %igen PAS-Lösung je 10^7 Protoplasten.

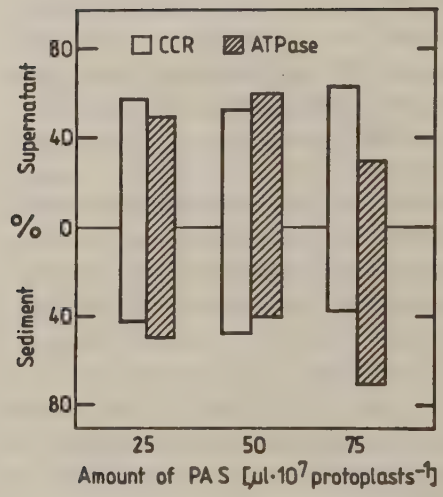


Abb. 33: Einfluß der Menge an Polyacrylsäure auf das Sedimentationsverhalten von ATPase und CCR. Protoplasten wurden mit MES-TRIS-Puffer gereinigt und mit 5 µl "microbeads" je 1,5 * 10^7 Protoplasten behaftet. Weitere Bedingungen s. Abb. 32.

2.3. Belege für die Wirksamkeit der "microbeads" und weitere Verbesserungen der Methodik

2.3.1. Differentielle Zentrifugation des Lysates

Abb. 34 zeigt die prozentuale Verteilung von ATPase und Cytochrom-C-Oxidase bei differentieller Zentrifugation eines Lysates "microbeads"-behandelter Protoplasten im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden jeweils parallele Ansätze mit und ohne EGTA im Lysemedium durchgeführt. Die Reinigung der Protoplasten und die weiteren Manipulationen erfolgten in PI-3B, das Lysemedium bestand aus 100 mM HEPES, 10 mM KCl

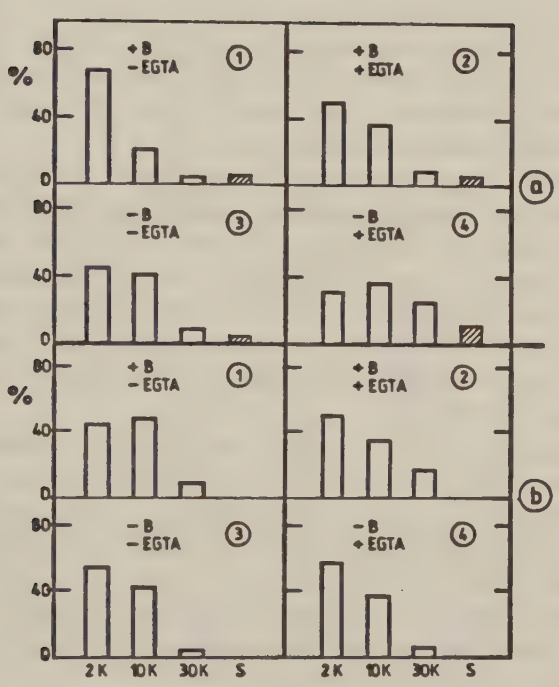


Abb. 34: Verteilung von ATPase (a) und CCO (a) bei differentieller Zentrifugation. Protoplasten wurden im Medium PI-3B gereinigt und mit "microbeads" behaftet (1+2). Die Lyse erfolgte mit oder ohne EGTA im Lysemedium (250 mM Saccharose). Die Ansätze 3 und 4 wurden parallel ohne "microbeads" und PAS durchgeführt. Die Summe der Aktivitäten in den vier Fraktionen wurde 100 % gesetzt.
S = Überstand der 30 K-Zentrifugation.

und 250 mM Saccharose (pH 8). Nach der Lyse wurde 5 min bei 2000 g zentrifugiert, das Sediment bei allen Ansätzen in Lysemedium ohne EGTA resuspendiert. Im Sediment finden sich mit "microbeads" 70 % (-EGTA) bzw. 50 % (+EGTA) der ATPase-Aktivität, bei der jeweiligen Kontrolle deutlich weniger.

Viele Mitochondrien sedimentieren ebenfalls bereits bei 2000 g; dabei ist jedoch das Verteilungsmuster durch die Anwendung von "microbeads" nicht beeinflußt, d.h. es findet keine Verklumpung der Mitochondrien statt. Dies gilt auch, wenn EGTA nicht dem Lysemedium zugesetzt wird.
Aus diesem Experiment wurde gefolgert, daß EGTA im Lysemedium nicht zwingend notwendig ist; es wurde deshalb bei den folgenden Versuchen weggelassen. Es wurde bereits erwähnt, daß bei *Daucus* die Aktivität der Glucansynthase II durch Komplexbildner z.T. irreversibel gehemmt wird (INGOLD, 1982); damit konnte mit dem modifizierten Lysemedium bei weiteren Experimenten auch die GT II U als Leitenzym herangezogen werden.
Ein Argument gegen die selektive Anreicherung der Plasmamembran im Sediment könnte folgendermaßen vorgebracht werden: Durch die Behandlung der Protoplasten mit "microbeads" und PAS wird die Aktivität der an die Plasmamembran gebundenen ATPase selektiv erhöht und/oder die Aktivität intrazellulärer ATPasen gehemmt; damit erschiene die Verteilung in Sediment und Überstand lediglich verzerrt, ohne daß mehr Material (Plasmamembran) sedimentiert wäre.
Die Ergebnisse des folgenden Experimentes können allerdings gegen diesen Einwand herangezogen werden.

2.3.2. Zentrifugation des Lysates über eine Stufe aus 45 % (w/w) Saccharose

Protoplasten wurden unter den in 2.3.1. angegebenen Bedingungen mit "microbeads" behaftet, die Lyse erfolgte mit Standard-Lysemedium. 3 ml des Lysates wurden auf 3 ml einer 45 % (w/w) Saccharose-Stufe (10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 8) geschichtet, dann 30 min bei 6000 g zentrifugiert.
Bei der Kontrolle war nach der Zentrifugation eine dichte Bande an der Phasengrenze zu beobachten; am Boden des Bechers befand sich ein dünnes Sediment. Bei der Probe, bei der die Protoplasten mit "microbeads" behandelt worden

Abb. 35: Verteilung von ATPase und CCR bei Zentrifugation über einen Stufengradienten von 45 % (w/w) Saccharose. Protoplasten wurden in PI-3B gereinigt und mit "microbeads" behaftet. Die Lyse erfolgte mit Standard-Lysemedium. Die Zentrifugation erfolgte mit 6000 g (30 min). a) Kontrolle, b) Protoplasten mit "microbeads" OV = Überstand mit Material der Phasengrenze; C = Stufe; P = Sediment.

waren, war die Bande an der Phasengrenze dünn, dagegen war ein deutliches Sediment vorhanden. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Verteilung von Leitenzymen wider (Abb. 35). Bei der Kontrolle finden sich im "overlay" fast 80 % der ATPase und nahezu gleichviel an CCR; deutlich weniger Prozent sind in der Saccharose-Stufe und im Sediment. Im anderen Fall jedoch sind 72 % der ATPase-Aktivität durch die 45 %-Stufe gewandert, obwohl eine niedertourige Zentrifugation angewendet wurde. Dies ist als Folge der hohen Dichte der "microbeads" anzusehen und wurde ebenfalls von SCHMIDT et al. (1983) beobachtet. Leider sind auch 40 % der CCR im Sediment; dies ist auf einen hohen Anteil an unlysierten,

jedoch mit "microbeads" behafteten Protoplasten zurückzuführen. Im Falle der Kontrolle läuft dieser Anteil lediglich auf die Stufe auf und bildet eine dichte Bande. Dieses Verhalten ist im Hinblick auf die Reinigung der Plasmamembran bedauerlich, zeigt aber die Wirksamkeit der "microbeads". Die Wiederfindungsrate an Enzymaktivitäten zeigt die Tabelle 10; dabei wurde das jeweilige Lysat als 100 % gesetzt.

Tab. 10: Wiederfindungsrate an Enzymaktivitäten bei der Zentrifugation eines Lysates von Protoplasten über eine Saccharose-Stufe von 45 % (w/w). (Lysat = 100 %)

	Kontrolle	Protoplasten mit "microbeads"
ATPase :	95 %	99 %
Cytochrom C-Reduktase:	92 %	100 %

Im folgenden Experiment wurde der Einfluß von zweiwertigen Ionen im Reinigungsmedium auf die Verteilung der Enzymaktivitäten untersucht. Dabei wurde das sonst für die Reinigungsschritte nach der Isolierung der Protoplasten übliche Medium PI-3 auch beim Anheften der "microbeads" und den weiteren Schritten bis zur Lyse verwendet; lediglich beim letzten Waschschritt vor der Lyse wurde PI-3S verwendet. Im Vergleich wurden alle Schritte mit PI-3S druchgeführt; als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz mit diesen Medien, ohne daß die Protoplasten mit "microbeads behaftet wurden. Abb. 36 zeigt wiederum nur Unterschiede im Sedimentationsverhalten der ATPase; Protein und die weiteren Enzyme haben in allen Fällen keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster. Insbesondere stören zweiwertige Ionen im Reinigungsmedium nicht das Anheften der "microbeads" und führen zu keiner Aggregation bei der anschließenden Lyse (Ansatz a). Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die langwierige Prozedur beim folgenden Experiment mit radioaktivem Concanavalin A von Bedeutung und wird dort wieder aufgegriffen. Zunächst soll jedoch im Anschluß zu den Ergebnissen aus Abb. 36 ein

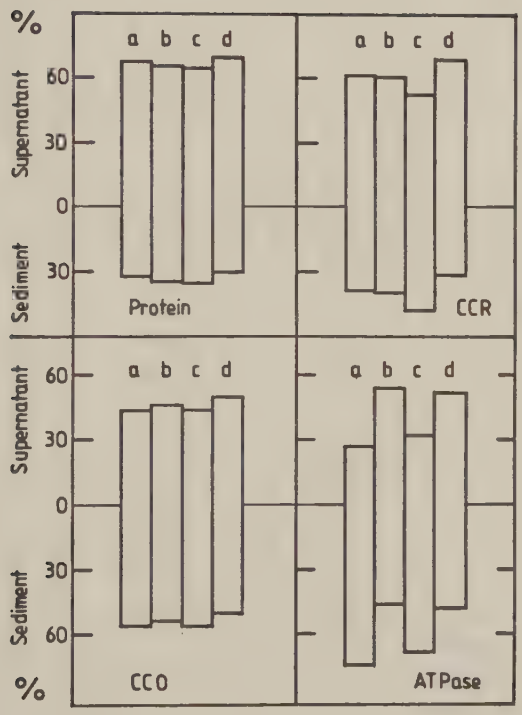


Abb. 36: Einfluß von zweiwertigen Ionen im Medium bei den Schritten nach der Isolierung der Protoplasten bis zur Lyse auf das Sedimentationsverhalten von Enzymen und Protein bei niedertouriger Zentrifugation.
a) mit "microbeads", PI-3
b) ohne "microbeads", PI-3
c) mit "microbeads", PI-3B
d) ohne "microbeads", PI-3B
PI-3B = Medium PI-3 ohne zweiwertige Ionen.

zusätzliches Experiment zur Reinigung der Plasmamembran geschildert werden. Die Sedimente aus den Ansätzen a-d wurden in Lysemedium resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 2000 g), um eine stärkere Anreicherung der ATPase zu erzielen. Tab. 11 zeigt die Anreicherung der ATPase im Vergleich zu Protein, CCO und CCR; dabei wurden die Prozentwerte aus dem Verteilungsmuster zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Tab. 11: Anreicherung der ATPase bei zweifacher Zentrifugation (5 min, 2000 g) eines Lysates. Weitere Bedingungen s. Legende der Abb. 36

Anreicherung gegenüber:	Protein	CCO	CCR
Sediment 1a:	2,3	1,3	1,9
b:	1,4	0,9	1,2
c:	1,9	1,3	1,5
d:	1,6	0,9	1,4
Sediment 2a:	1,7	1,0	1,2
b:	1,0	1,0	1,2
c:	1,9	1,2	1,5
d:	1,7	1,4	1,7

Es zeigt sich, daß durch den weiteren Reinigungsschritt die Anreicherung nicht verbessert werden kann.
Die Möglichkeit, die Reinigung der Protoplasten und die weiteren Schritte vor der Lyse auch bei der Behandlung mit "microbeads" mit dem normalen Medium PI-3, das zweiwertige Ionen enthält, durchführen zu können, ist für das folgende Experiment mit radioaktivem Concanavalin A von Bedeutung. Das Ziel war dabei eine externe Markierung der Protoplasten, um so die Wirksamkeit der "microbeads" zu überprüfen. Damit könnte auch das Argument entkräftet werden, daß die stärkere Anreicherung der ATPase im Sediment auf einer bloßen Steigerung des sedimentierten Anteils und/oder auf die Senkung des nicht sedimentierten Anteils zurückzuführen ist. Durch die zusätzlichen Schritte bei der Inkubation mit Concanavalin A

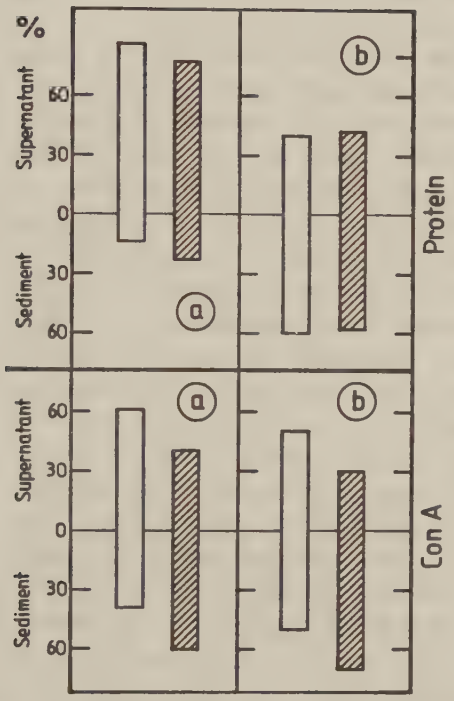


Abb. 37: Verteilung von radioaktivem Concanavalin A und Protein bei der Zentrifugation (1000 g, 5 min) eines Lysates von Protoplasten.
Schraffiert: Protoplasten mit "microbeads".
a) Lyse mit Ultraschall
b) nur osmotische Lyse.

und den erforderlichen Waschungen wurde die Vitalität der Protoplasten und damit das Lyseverhalten stark beeinträchtigt. Alle Schritte nach der Isolierung bis zur Lyse wurden zunächst ohne zweiwertige Ionen und ohne Saccharose in den Medien durchgeführt. Nach der Lyse sedimentierten in jedem Fall 60 - 90 % des Proteins; somit war natürlich ein Vergleich zwischen Kontrolle und mit "microbeads" behandelten Protoplasten nicht mehr sinnvoll. Eine weitere Schwierigkeit beruht auf der Tatsache, daß auch durch bloße Behandlung mit Concanavalin A eine stärkere Sedimentation der Plasmamembran bei niedertouriger Zentrifugation erfolgt; dies wurde bei *Saprolegnia* zur Anreicherung der Plasmamembran benutzt (GIRARD und FEVRE, 1984). Es war also notwendig, die Markierung der Protoplasten mit möglichst geringer Menge an Concanavalin A durchzuführen. Die Verwendung des Mediums PI-3S (mit zweiwertigen Ionen) in allen Schritten nach der Isolierung der Protoplasten verbesserte die Lyse; zusätzlich wurde je eine Hälfte der Lysate mit Ultraschall (10 sec) behandelt. Abb. 37 zeigt die Verteilung von Protein und radioaktivem Concanavalin A nach der Zentrifugation des Lysates; die Lyse erfolgte hier mit Sorbit als Osmotikum im Lysemedium, um ein Auswaschen des gebundenen Concanavalin A zu vermeiden. Bei der Lyse mit Ultraschall (a) ist der Proteinanteil im Sediment deutlich vermindert, bei osmotischer Lyse allein (b) sedimentieren 60 % des Proteins. Dabei sind keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontrolle und Protoplasten, die mit "microbeads" behandelt wurden, zu erkennen. Wenn die Protoplasten mit "microbeads" behandelt worden waren, finden sich in beiden Fällen 20 % mehr der radioaktiven Markierung im Sediment. Es sind jedoch 30 - 40 % der Aktivität im Überstand, davon sind etwa 50 % durch Zentrifugation (30000 g, 1h) sedimentierbar. Ein Teil der Radioaktivität im 1000 g-Überstand scheint also auf nichtgebundenes oder wieder abdissoziiertes Concanavalin A zurückzuführen sein, da bei den gewählten Zentrifugationsbedingungen die GT II U fast vollständig sedimentiert. Ein anderer Teil ist membrangebunden;

dies zeigt, daß vermutlich nicht die gesamte Plasmamembran bei der niedertourigen Zentrifugation sedimentiert ist.

Ein letzter Beleg für die Wirksamkeit der "microbeads" sollte die Auftrennung des niedertourigen Überstandes des Lysats auf einem linearen Saccharose-Gradienten erbringen. Wenn die Plasmamembran bei mit "microbeads" behandelten Protoplasten zum großen Teil schon bei der niedertourigen Zentrifugation sedimentiert, sollten die Aktivitäten der entsprechenden Leitenzyme bei der Auftrennung des Überstandes deutlich reduziert sein. Gleichzeitig sollte die Auftrennung der Endomembranen mit verminderter Kontamination durch Plasmalemma möglich sein. Abb. 38 zeigt die Verteilung von Protein und enzymatischen Aktivitäten jeweils im Vergleich von Kontrolle und von Protoplasten, die mit "microbeads" behandelt worden waren. Als Leitenzyme für die Plasmamembran wurden dabei die Steroyl-Glucosyltransferase und GT II U benutzt. Das Muster der Proteinverteilung ist sehr ähnlich; dies gilt auch für die GT I G, das Leitenzym des Golgi-Apparates. Keine nennenswerten Unterschiede finden sich auch bei der CCO (Mitochondrien) und, mit kleinen Abstrichen in den letzten Fraktionen, bei der CCR (ER).
Augenfällig sind die Unterschiede bei der Steroyl-Glucosyltransferase und der GT II U; die Aktivitäten im Gradienten sind deutlich reduziert, wobei jeweils höhere Aktivität im Sediment gefunden wird. Bemerkenswert ist bei der Kontrolle, daß jetzt deutlich zwei Gipfel im Gradienten auftreten, wobei der erste wiederum in der Region des Golgi-Apparates zu finden ist; der zweite liegt bei höherer Dichte und hat mehr Aktivität als die Schulter in Abb. 30. Bei diesem Experiment wurden die Protoplasten gleichfalls durch Kurzzeitisolierung hergestellt. Das Enzymgemisch wurde ebenfalls für 10 min bei 50 ° C inkubiert, um Proteasen zu reduzieren; außerdem enthielt die Enzymlösung 2 mg/ml BSA.
Festgehalten werden muß insbesondere, daß sich die Endomembranen auch nach der Behandlung der Protoplasten mit "micro-

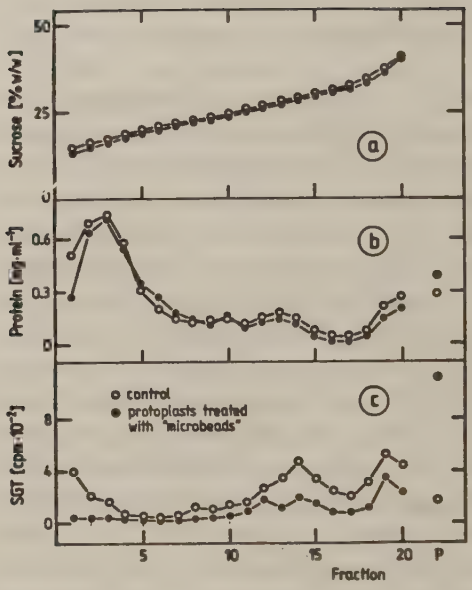


Abb. 38: Einfluß von "microbeads" auf die Verteilung von Enyzmaktivitäten und Protein in einem linearen Gradienten von 18 - 38 % Saccharose (w/w) mit einem Kissen von 2 ml 50 %iger Saccharoselösung. Das Enzymgemisch zur Protoplastenisolierung enthielt 2 mg/ml BSA und wurde für 10 min bei 50 °C inkubiert. Der 1000 g-Überstand des Lysates wurde aufgetragen. Das Gradientenmedium enthielt 1 mM DTT und 0,1 mM $MgSO_4$, das Lysemedium 1 mM DTT. Laufdauer: 13 h
Offene Symbole: Kontrolle
Ausgefüllte Symbole: Protoplasten mit "microbeads"

beads" auftrennen lassen; es sind keine deutlichen Änderungen in der Dichte im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

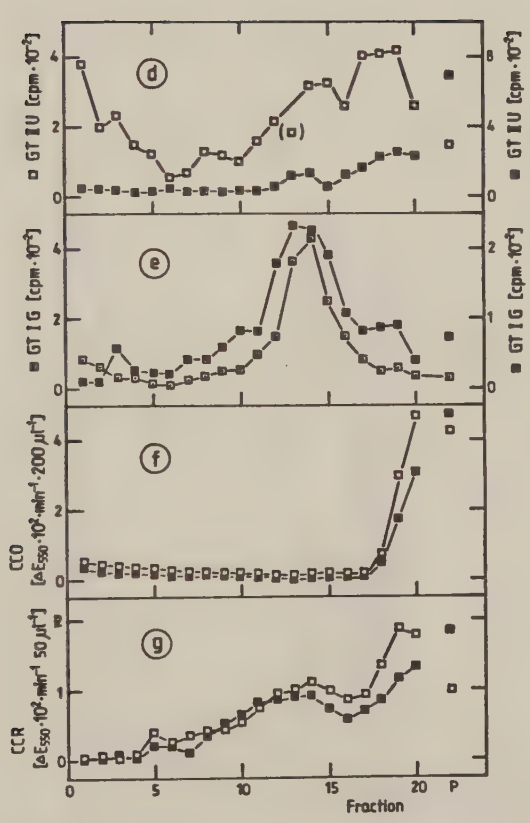


Abb. 38 (Fortsetzung)

2.4. Reinigung der Plasmamembran mit Hilfe von "microbeads"

Die unter 2.3. angeführten Experimente zur Wirksamkeit der "microbeads" können als Ausgangspunkt für die weiteren Versuche zur Reinigung der Plasmamembran angesehen werden. Zunächst wurde der Stufengradient aus Abb. 35 durch einen linearen Gradienten von 20 - 45 % (w/w) Saccharose ersetzt.

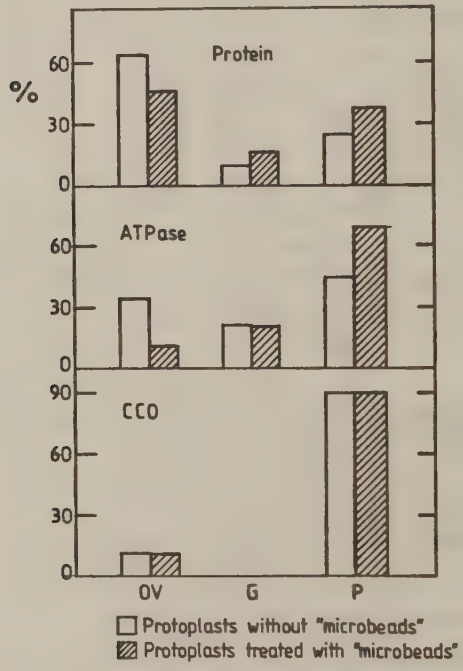


Abb. 39: Verteilung von Protein, ATPase und CCO bei Zentrifugation eines Lysates von Protoplasten über einen linearen Gradienten von 20 - 45 % Saccharose (w/w). Die Aufarbeitung erfolgte unter Standardbedingungen. Die Zentrifugationsdauer betrug 30 min (6000 g).
OV = Überstand mit Phasengrenze; G = Gradient; P = Sediment.

Abb. 39 zeigt, daß diese Änderung keine verbesserte Reini-

gung der ATPase erbringt; im Gegenteil ist auch bei der Kontrolle (Protoplasten unbehandelt) das Sediment deutlicher ausgeprägt. Dies wird auch aus der Proteinverteilung ersichtlich.

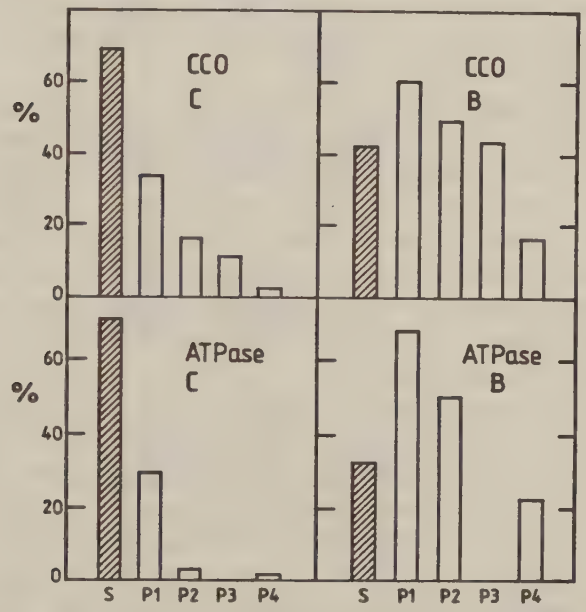


Abb. 40: Sedimentationsverhalten von ATPase und CCO bei mehrfacher Sedimentation und abschließender Zentrifugation über einen 2stufigen Saccharosegradienten. Die Protoplasten wurden mit "microbeads" behaftet und lysiert. Die Zentrifugationen erfolgten jeweils bei 1000 g für 5 min, beim Sufengradiengradienten 60 min bei 6000 g.
S = Überstand der 1. Zentrifugation; P1 - P4: Sedimente; Aus P3 wurde keine ATPase bestimmt.

Der nächste Ansatz verfolgte eine Kombination aus mehrfachen Waschvorgängen mit einer abschließenden Zentrifugation über einen zweistufigen Gradienten. Das Lysat wurde zentrifugiert und das Sediment mehrfach gewaschen und anschließend auf den

Stufengradienten gegeben. Abb. 40 zeigt, daß bei diesem Vorgehen die ATPase-Aktivität im Verlauf der Zentrifugationsschritte fast ganz ausgewaschen wird; dies gilt ebenso für die CCO. Die Cytochrom C-Oxidase zeigte dabei ausnahmsweise ein etwas anderes Sedimentationsverhalten im Vergleich zur Kontrolle. Es war auf diese Art nicht möglich, die störende Verunreinigung aus unlysierten Protoplasten oder aggregiertem Material abzutrennen.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob aus dem Lysat sedimentierbare Aktivität bei kurzer Zentrifugationsdauer und unterschiedlicher Beschleunigung in 2 Anteile getrennt werden kann. Das Lysat wurde auf einen zweistufigen Saccharose-Gradienten gegeben (30/60 %; w/w). Dann wurde 10 min zentrifugiert und danach die obere Fraktion F1 bis knapp an die 30/60 %-Phasengrenze und das Material an der Phasengrenze (F2) abgenommen. Das Sediment wurde in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert (F3). F2 und F3 wurden mit Lysemedium auf das Volumen von F1 ergänzt. Abb. 41 zeigt, daß sich die unterschiedliche Zentrifugation nicht deutlich auf die Proteinverteilung auswirkt. Der Anteil von CCO in der Fraktion F1 wird mit zunehmender Beschleunigung kleiner, dafür erscheint mehr in der Fraktion F2; dies gilt ebenso für die CCR. GT II U hat bei 1000 g in der Fraktion F3 etwa gleiche Anteile wie CCR und CCO; bei 6000 g ändert sich die Verteilung zugunsten von F3, wobei der Anteil in F2 fast gleich bleibt. Bei niedriger Beschleunigung sedimentiert also ein Anteil nach F3, der nicht angereichert ist im Vergleich zu CCR und CCO; erst bei stärkerer Zentrifugation sedimentieren dann bei der gewählten Zentrifugationsdauer auch Anteile an GT II U-Aktivität, die zu einer Anreicherung führen.

Nimmt man die Fraktion F2 aus der 2000 g-Zentrifugation und gibt sie auf einen weiteren gestuften Gradienten, so läßt sich damit eine 7fache Anreicherung der GT II U erzielen; die Ausbeute beträgt 25 %.

Damit war gezeigt, daß sich mit dieser Methode die GT II U

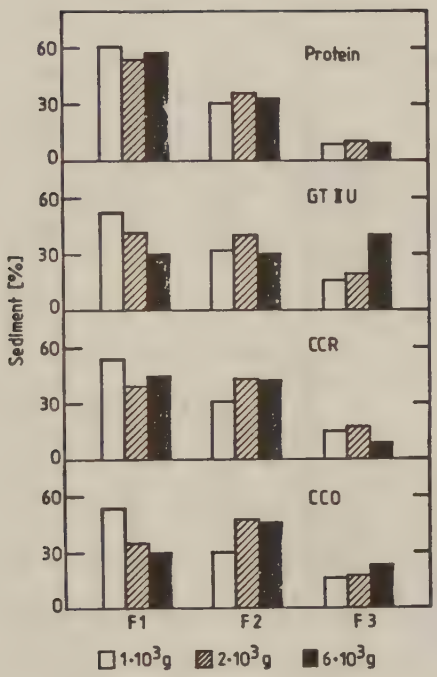


Abb. 41: Verteilung von Protein und Enzymen bei Zentrifugation eines Lysates von Protoplasten über einen zweistufigen Saccharose-Gradienten (30/60 %; w/w) mit unterschiedlicher Beschleunigung. Die Aufarbeitung erfolgte unter Standardbedingungen. Alle Protoplasten wurden mit "microbeads" behaftet. Die Zentrifugationsdauer betrug jeweils 10 min.
F1: Überstand der 30/60 %-Phasengrenze
F2: Bande an der 30/60 %-Phasengrenze
F3: 60 %-Stufe und Sediment.

mit geringem zeitlichen Aufwand stärker anreichern läßt; dabei war es wichtig, zunächst den Anteil nicht lysierter Protoplasten (F3) abzutrennen.

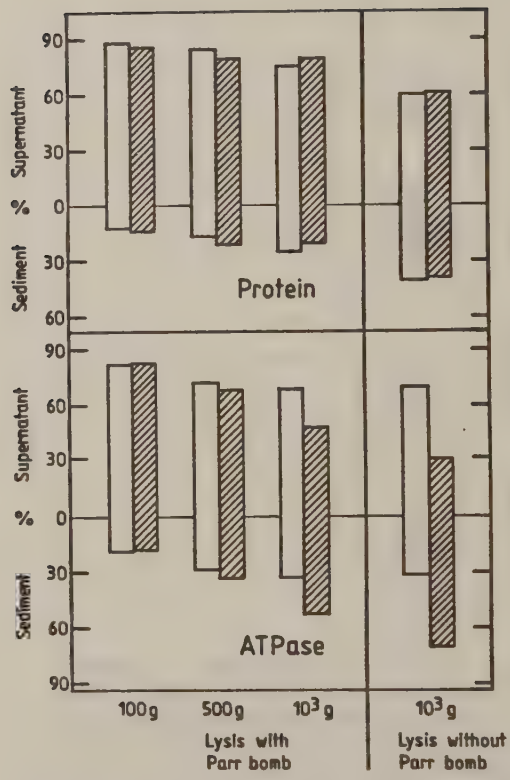


Abb. 42: Einfluß der Lyse in einer Parr-Bombe auf das Sedimentationsverhalten von Protein und Enzymen. Protoplasten wurden unter Standardbedingungen aufgearbeitet. Ein Teil der Proben wurde nach 45 min osmotischer Lyse zusätzlich in einer Parr-Bombe aufgeschlossen. Anschließend wurden Aliquots 5 min bei unterschiedlicher Beschleunigung zentrifugiert. Mit Schraffur: Protoplasten mit "microbeads". Ohne Schraffur: Protoplasten ohne "microbeads".

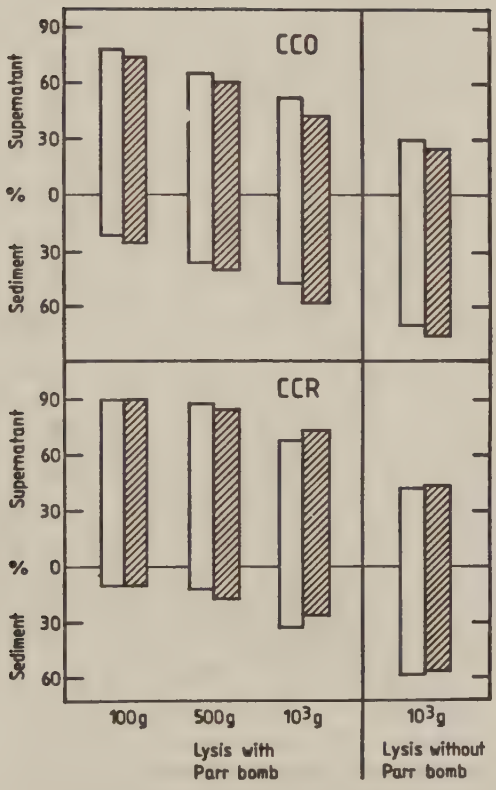


Abb. 42 (Fortsetzung)

Es blieb jedoch wünschenswert, die Menge nicht lysierter Protoplasten oder aggregierten Materials zu reduzieren, um eine bessere Reinigung zu erzielen. Deshalb wurde versucht,

das Lyseverhalten der Protoplasten zu verbessern. Dazu sollte eine Methode gefunden werden, die einerseits zu einem besseren Aufschluß führt, andererseits aber die Aktivitäten der zu untersuchenden Enzyme nicht wesentlich reduziert.
Zunächst wurde die Lyse zusätzlich mit dem Aufschluß in einer Parr-Bombe unterstützt; Proben des Lysates wurden dann 5 min bei unterschiedlicher Beschleunigung zentrifugiert. Als Kontrolle dienten Ansätze mit normalem Aufschluß, d.h. osmotische Lyse ergänzt durch Homogenisieren in einem Homogenisationsgefäß nach Potter-Elvehjem. Jeder Ansatz wurde mit "microbeads" behandelten bzw. unbehandelten Protoplasten durchgeführt (Abb. 42).
Wiederum zeigen dabei sowohl Protein als auch CCR und CCO keine nennenswerten Unterschiede. Lediglich die ATPase zeigt Differenzen, die aber erst bei stärkerer Zentrifugationskraft deutlich werden und bei der Standard-Lyse am ausgeprägtesten sind. Allerdings ist bei Aufschluß in der Parr-Bombe der Prozentsatz an sedimentiertem Protein und CCR bzw. CCO deutlich reduziert. Tab. 12 zeigt die Anreicherung der ATPase gegenüber Protein und Enzymaktivitäten; die Prozente der Sedimente wurden dabei ins Verhältnis gesetzt.

Tab. 12: Anreicherung der ATPase gegenüber Protein und Enzymaktivitäten in niedertourigen Sedimenten. Die Bedingungen entsprechen denen der Abb. 42

Aufschluß:	"microbeads":	Protein	CCR	CCO
mit Parr-Bombe				
100 g	+	1,5	1,8	0,7
	–	1,6	1,8	0,8
500 g	+	1,6	1,8	0,8
	–	1,6	1,5	0,8
1000 g	+	2,4	2,0	0,9
	–	1,3	1,0	0,7
Standard-Lyse				
1000 g	+	1,8	1,3	0,9
	–	0,75	0,5	0,4

Die Werte liegen für die Ansätze mit "microbeads" behandelten Protoplasten bei höherer Zentrifugationsbeschleunigung (1000 g) wesentlich günstiger als für unbehandelte Protoplasten; der Aufschluß mit der Parr-Bombe wirkt sich etwas verbessernd aus, wobei allerdings der Prozentsatz sedimentierter Aktivität reduziert ist. Insgesamt wurde durch den Aufschluß in der Parr-Bombe die Aktivität der ATPase nicht meßbar beeinflußt, die der CCO leicht erhöht.
In weiteren Versuchen wurde das Lysat durch eine Spritze mit enger Kanüle mehrfach auf- und abgesogen; weiterhin wurde versucht, die Aggregate mit feinen Nylonnetzen abzufiltrieren. Dies führte nicht zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der GT II U.
Im folgenden Experiment wurde die Lyse zusätzlich mit Ultraschall (10 sec, Stufe 5) unterstützt (Abb. 43). Proben des Lysates wurden dann bei unterschiedlicher Beschleunigung zentrifugiert, jeweils parallel mit einer Probe eines Standard-Lysates ohne Ultraschall-Behandlung. Es wurden nur mit "microbeads" behandelte Protoplasten eingesetzt. Wie bei der Lyse mit der Parr-Bombe ist auch durch Ultraschall der Aufschluß verbessert; es sedimentieren deutlich weniger Protein und Mitochondrien. Es ist jedoch auch der Anteil an GT II U im Sediment erniedrigt. Für die Berechnung der Anreicherung von GT II U wurden ebenfalls die Prozentwerte des Sediments ins Verhältnis gesetzt (Tab. 13).

Tab. 13: Anreicherung von GT II U gegenüber Protein und CCO im Sediment bei niedertouriger Zentrifugation eines Lysates. Der Aufschluß der mit "microbeads" behandelten Protoplasten erfolgte mit Standard-Lyse mit bzw. ohne Ultraschall.

Beschleunigung	Ultraschall	Protein	CCO
1000 g	+	1,7	2,1
	–	1,6	1,4
2000 g	+	2,4	1,2
	–	1,6	1,0

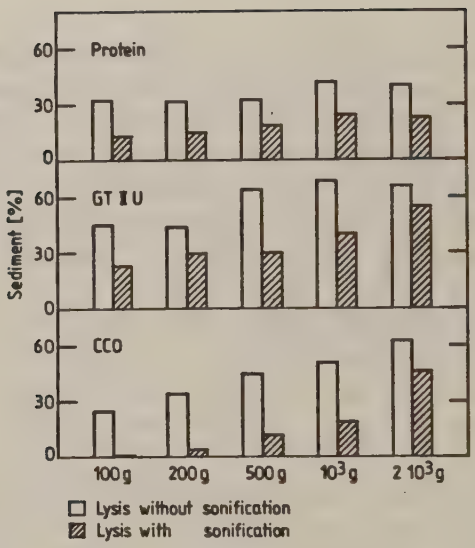


Abb. 43: Einfluß von Ultraschall-Behandlung des Lysates auf das Sedimentationsverhalten von Protein und Enzymen. Protoplasten wurden mit "microbeads" behaftet und lysiert. Ein Teil der Proben wurde mit Ultraschall behandelt. Aliquots wurden jeweils 5 min bei unterschiedlicher Beschleunigung zentrifugiert. Das Sediment wurde in Lysemedium resuspendiert.
Mit Schraffur: osmotische Lyse und Ultraschall (10 sec)
Ohne Schraffur: nur osmotische Lyse

Durch die Ultraschall-Behandlung werden in der Anreicherung von GT II U bei einfacher Zentrifugation (5 min) des Lysates etwa die gleichen Werte erzielt wie bei der Lyse mittels der Parr-Bombe.

Die Aktivität der GT II U ist durch die zusätzliche Behandlung um 19 % reduziert; die spezifische Aktivität im Lysat betrug ohne Ultraschall-Behandlung 712 pMol*(min Testzeit)$^{-1}$*(mg Protein)$^{-1}$.

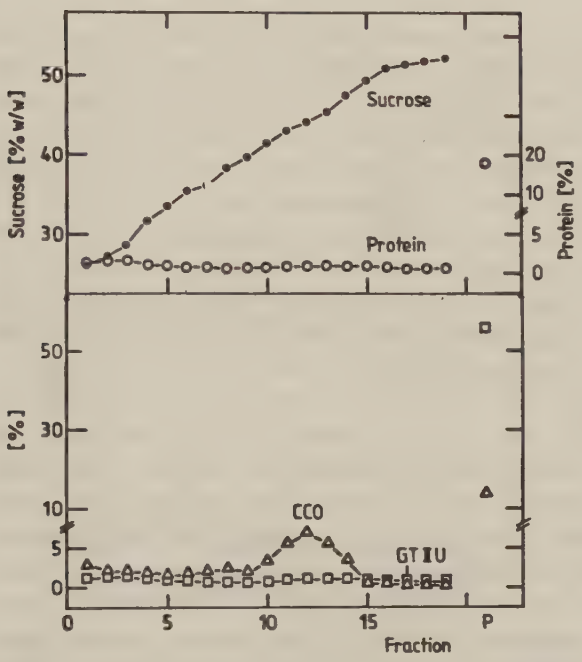


Abb. 44: Verteilung von Protein und Enzymaktivitäten in einem linearen Gradienten von 30 - 55 % (w/w) Saccharose. Protoplasten wurden unter Standardbedingungen mit "microbeads" behaftet und lysiert. Das Lysat wurde 5 min bei 2000 g zentrifugiert und das Sediment in 25 %iger Saccharose-Lösung resuspendiert und auf den Gradienten aufgetragen. Zentrifugationsdauer: 15 h. Die Werte des Lysates wurden als 100 % gesetzt. P = Sediment.

Im nächsten Versuch wurde nochmals ein linearer Gradient angewendet, allerdings von 30 - 55 % (w/w) Saccharose. Die Protoplasten wurden mit "microbeads" behandelt; das Lysat wurde bei 2000 g 5 min zentrifugiert, das Sediment in 25 % Saccharose resuspendiert; diese Probe wurde auf den Gradienten aufgetragen. Es sollte geprüft werden, welchen Einfluß diese erhöhte Saccharose-Dichte auf die Trennung von unerwünschtem Material hat; zusätzlich wurde bei hoher Beschleu-

nigung (100000g) länger zentrifugiert (15 h). Es zeigte sich, daß auch bei dieser Vorgehensweise immer noch ein großer Teil des ursprünglichen Proteins des Lysates im Sediment zu finden ist (Abb. 44). Ein Teil der Mitochondrien kann ausgewaschen werden und findet sich mit einem Gipfel bei 43 % (w/w) Saccharose im Gradienten wieder. Im Sediment befinden sich 56 % der Aktivität der GT II U und 14 % der CCO. Die Prozentwerte wurden durch Multiplikation der prozentualen Verteilung im Gradienten mit den entsprechenden Werten des 2000 g Sedimentes erhalten. Vom Protein, das auf den Gradienten aufgetragen wurde, finden sich etwa 53 % im Gradienten wieder.

Der Versuch zeigt, daß auch nach Sedimentation des Lysates ein Teil der Kontamination ausgewaschen werden kann. Ein Teil des aggregierten Materials sedimentiert aber auch unter diesen Bedingungen; dies zeigen die etwa übereinstimmenden Prozentwerte von Protein und CCO im Sediment des Gradienten. Es blieb also weiterhin die Frage, wie die unlysierten Protoplasten oder aggregiertes Material abgetrennt werden können, ohne daß auch die mit "microbeads" behaftete Plasmamembran in diese Fraktion gelangt. Ein möglicher Weg mit einer kurzen Zentrifugation durch Saccharose-Stufen wurde bereits aufgezeigt (Abb. 41).

Eine weitere Möglichkeit zeigt das folgende Experiment (Abb. 45). Das Lysat wurde nach der Lyse mit 60 % (w/w)-Saccharose-Lösung (20 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 8) auf eine bestimmte Konzentration eingestellt. Gleiche Volumina der Proben wurden dann bei 100 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment wurde im gleichen Volumen der entsprechenden prozentualen Mischung aus Lysemedium und 60 %iger Saccharose-Lösung resuspendiert.

Bei der Kontrolle (Abb. 45b) waren die Protoplasten nicht mit "microbeads" behandelt worden. Bei allen Saccharose-Konzentrationen sedimentieren Protein, CCO und GT II U mit jeweils etwa gleichen Prozentsätzen.

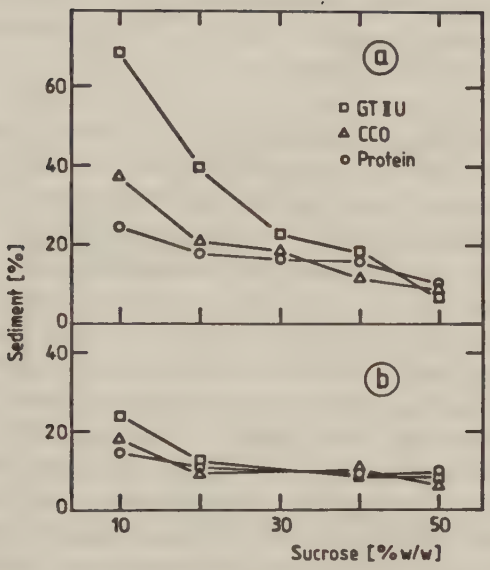


Abb. 45: Sedimentationsverhalten von Protein und Enzymaktivitäten bei Zentrifugation von Lysaten mit unterschiedlicher Saccharose-Konzentration. Die Protoplasten wurden unter Standardbedingungen aufgearbeitet und lysiert. Nach der Lyse wurde auf eine bestimmte Saccharose-Konzentration eingestellt und 5 min bei 100 g zentrifugiert.
Summe aus Überstand und Sediment = 100 %
a) Protoplasten mit "microbeads"
b) Protoplasten ohne "microbeads"

Waren die Protoplasten mit "microbeads" behandelt, zeigte die GT II U erwartungsgemäß ein anderes Sedimentationsverhalten (Abb. 45a). Bei 10 bzw. 20 % Saccharose findet sich ein wesentlich größerer Anteil im Sediment als von Protein oder CCO. Dies kann wiederum als Beweis für die Wirksamkeit der "microbeads" angesehen werden. Ab 30 % Saccharose sind die Prozentwerte ähnlich und liegen zunächst höher als bei

der Kontrolle. Aufgrund der Größe sedimentieren aggregiertes Material und nicht lysierte Protoplasten schneller als Vesikel oder "sheets". Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem erwähnten Experiment aus Abb. 41.

Damit bot sich eine weitere Möglichkeit, aggregiertes Material vor der Reinigung der Plasmamembran abzutrennen. Im folgenden Experiment wurde nach 45-minütiger Lyse das Lysat auf 30 % (w/w) Saccharose eingestellt und anschließend 5 min bei 100 g zentrifugiert. Im Sediment befanden sich 23 % des Proteins, 25 % der CCO- und 27 % der GT II U-Aktivität. Der Überstand wurde mit 100 mM HEPES (pH 8) auf 10 % (w/w) rückverdünnt und 5 min bei 6000 g zentrifugiert, um die "sheets" der Plasmamembran zu sedimentieren. Das Sediment wurde in Lysemedium resuspendiert und 10 sec mit Ultraschall behandelt. Danach wurde die Suspension auf einen linearen Gradienten von 30 - 50 % (w/w) Saccharose aufgetragen und 13 h bei 100000 g zentrifugiert. Ein großer Teil des Proteins ebenso wie der GT I G- und CCO-Aktivität findet sich im Gradienten wieder (Abb. 46); die Dichte im Bereich der jeweiligen Gipfelfraktionen ist gegenüber den in B) 1. angeführten linearen Gradienten nicht wesentlich verändert. Im Gegensatz zu Abb. 44 findet sich auch ein Teil der GT II U-Aktivität im Gradienten wieder; dies beruht auf der stärkeren Beschleunigung (6000 g), die zur Sedimentation des 100 g-Überstandes angewendet wurde; dies erschien notwendig, da wegen der Rückverdünnung von 30 auf 10 % Saccharose mit großen Volumina gearbeitet werden mußte. Dieser Anteil der GT II U Aktivität stimmt in der Verteilung sehr gut mit der GT I G überein und dies kann, wie bei den linearen Gradienten aus B) 1., darauf hinaweisen, daß ein Teil der GT II U-Aktivität dem Golgi-Apparat zuzuschreiben ist.
Im Sediment finden sich 1,7 % des Proteins, 17 % der GT II U-Aktivität und 7,5 bzw. 8 % an GT I G und CCO. Die Prozentwerte beziehen sich dabei auf das Lysat nach dem Einstellen auf 30 % Saccharose und wurden durch Multiplikation

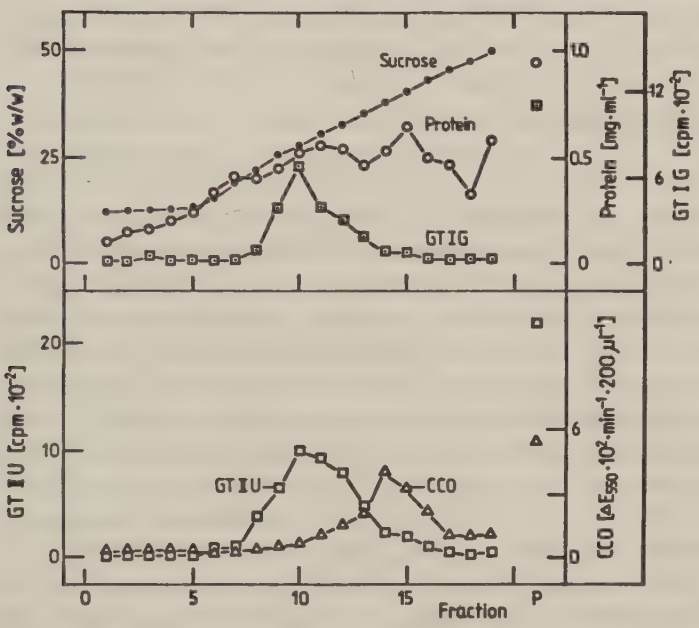


Abb. 46: Verteilung von Enzymaktivitäten und Protein in einem linearen Gradienten von 30 – 50 % (w/w) Saccharose.
Protoplasten wurden mit "microbeads" behaftet und lysiert. Nach 45 min wurde das Lysat auf 30 % Saccharose eingestellt und dann bei 100 g 5 min zentrifugiert. Der 100 g-Überstand wurde auf 10 % verdünnt und 5 min bei 6000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in Lysemedium resuspendiert und auf den Gradienten aufgetragen

der Prozentwerte der Verteilung bei den einzelnen Schritten erhalten. Damit ist die GT II U bei einer relativ guten Ausbeute um den Faktor 10 angereichert, ist aber nicht völlig frei von Kontaminationen durch den Golgi-Apparat und Mitochondrien.

IV. DISKUSSION

A) Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide bei Suspensionszellen und regenerierenden Protoplasten

Zellkulturen haben sich für die Untersuchung der Struktur und Synthese der primären Zellwand als sehr geeignet erwiesen. Vor allem die grundlegenden Arbeiten von Albersheim und seinen Mitarbeitern (Übersichtsartikel von DARVILL et al., 1980; MCNEIL et al., 1984) an *Acer pseudoplatanus* haben zu einem vorläufigen Modell der Zusammensetzung der primären Zellwand aus verschiedenen Einzelkomponenten und Bausteinen geführt; dies hat zahlreiche weitere Arbeiten auch an anderen Objekten angeregt. Bei diesen Analysen wurden neue Bausteine entdeckt, so z.B. das Rhamnogalacturonan II (DARVILL et al., 1978) mit dem bislang nur in Bakterien nachgewiesenen Zucker KDO (YORK et al., 1985). Damit kompliziert sich zwangsläufig das Modell der Zellwand von neuem. Durch unterschiedliche Extraktionsbedingungen können verschiedene Anteile herausgelöst werden; sie führen auch zu unterschiedlicher Degradation der Komponenten (FRY, 1986).
Weiterhin führen die unterschiedlichen Kulturbedingungen auch bei Zellinien der gleichen Art zu einem veränderten Aufbau der Zellwand. Dies macht die Charakterisierung des verwendeten Materials unumgänglich.

1. Charakterisierung der für die Untersuchungen verwendeten Zellinie DC_{81}

Die benutzte Zellinie DC_{81} war durch ein gutes und rasches Wachstum ausgezeichnet; das Maximum der Zellzahl lag am 7. Tag. Hier hat im Verlauf der Kultivierung eine deutliche Änderung zu früheren Zeitpunkten stattgefunden, wie ein Vergleich mit entsprechenden Daten von NOE (1982) und INGOLD (1985) zeigt. Das rasche Wachstum und ein einheit-

liches mikroskopisches Bild der Zellen lassen auf ein homogenes Zellmaterial schließen; dies begünstigt strukturelle Untersuchungen der Zellwand.

2. Untersuchung der Zellwand und der extrazellulären Polysaccharide von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen zeigen im Verlauf der Kultivierung drastische Unterschiede in der Menge an Zellwandmaterial. Am 4. Tag ist die Menge am niedrigsten, umgekehrt die Zellzahl je Gramm Frischgewicht am höchsten; es findet eine lebhafte Teilung statt. Ein ähnlicher Verlauf findet sich bei einer synchronisierten Kultur von *Catharanthus roseus* (AMINO et al., 1984) bei Beginn der Teilungsaktivität; die absolute Menge an Kohlenhydrat liegt bei diesem Objekt niedriger, wobei allerdings nur der Test nach DUBOIS et al. (1956) zur Berechnung herangezogen wurde.
Vergleichbare Daten von Karotten präsentieren auch ASAMIZU et al. (1983) für die Fraktionen der Zellwand im Verlauf der Kultivierung; die Autoren beziehen ihre Werte jedoch auf den zur Zellzahl proportionalen DNA-Gehalt. Für alle Fraktionen findet sich ein Minimum am 4. Tag.
Der Cellulose-Gehalt der Zellinie DC_{B1} ist am 5. Tag mit etwa 25 % am niedrigsten. Auch ASAMIZU et al. (1983) fanden ein Minimum mit 25,1 %. Bei ihrer *Daucus*-Kultur steigt der prozentuale Anteil der Cellulose auf 39 % in der logarithmischen Phase der Kultur; in diesem Punkt ist ebenfalls eine gute Übereinstimmung festzustellen.
Leider zeigen diese Autoren keine Daten über extrazelluläre Polysaccharide im Verlauf der Kultivierung; glücklicherweise ist jedoch *Daucus carota* ein Standardobjekt. MASUDA et al. (1984) führten einen Vergleich der Zellwandsynthese mit bzw. ohne 2,4-D im Medium anhand einer Kulturalterabhängigkeit durch. Im Unterschied zu Abb. 9 steigen bei ihrer Zellinie die extrazellulären Polysaccharide stetig an; die absolute Menge ist wesentlich geringer und beträgt höchstens

70 µg je ml Medium. Die Zelldichte der Kultur wurde leider nicht angegeben; aus den verfügbaren Daten ist jedoch abzuleiten, daß die Kultur ein anderes Wachstumsverhalten zeigt. Demgegenüber zeigt unsere Zellinie DC$_{81}$ am 5. Tag ein Maximum der ECP mit fast 200 µg je ml. Einen solchen Verlauf fanden auch TAKEUCHI und KOMAMINE (1978a) bei *Vinca rosea (syn. Catharanthus roseus)*. Für die anschließende Abnahme der Polysaccharide im Medium können mehrere Ursachen in Frage kommen: Zum einen ist es möglich, daß die zunächst ins Medium abgegebenen Komponenten nachträglich in die Zellwand integriert werden; dies ist um so besser vorstellbar, da der Wert für das gepackte Zellvolumen zwischen dem 5. und 9. Tag von 0,25 auf 0,5 steigt (Abb. 7). Denkbar ist jedoch auch, daß durch abbauende Enzyme die ECP teilweise wieder verdaut werden; sie könnten dann von den Zellen als Monomere aufgenommen werden; kleinere Bruchstücke könnten auch bei der Dialyse des Mediums verloren gehen.
Diese Frage könnte folgendermaßen geklärt werden: Zellen werden in einem Medium mit radioaktiv markierter Glucose oder Saccharose angezogen; auf diese Weise erhält man auch radioaktiv markierte ECP. Diese markierten extrazellulären Polysaccharide werden isoliert und einer anderen, 5 Tage alten Kultur zugesetzt; anschließend verfolgt man den Weg der Radioaktivität. Versuche dieser Art sind bereits unternommen worden, haben jedoch bislang noch nicht zu einem klaren Resultat geführt (AMINO, persönliche Mitteilung).
Die nähere Charakterisierung der Zellwand wurde vor allem an 5 Tage alten Suspensionszellen durchgeführt, um einen Vergleich mit der Zellwand regenerierender Protoplasten zu haben, die aus diesen Zellen dargestellt wurden.
Hier ist zunächst der hohe Anteil von Arabinose an den neutralen Zuckern der Polysaccharide (ohne Cellulose) auffällig; je nach Hydrolysebedingungen (Temperatur) kann der Anteil an Glucose und Galactose schwanken (EMMERLING, 1986).
STEVENS und SELVENDRAN (1984) fanden bei den Speicherwurzeln der Karotte eine wesentlich andere Zusammensetzung. Aller-

dings weisen die Zellwände in diesem Fall einen Anteil von 64,1 % an Cellulose auf. Dies zeigt, daß man nicht von der Zellwand eines Objektes sprechen kann, sondern daß sich die Funktion unterschiedlicher Gewebe auch in der molekularen Zusammensetzung der Zellwand bemerkbar macht. Ein Vergleich der Zusammensetzung der Zellwände aus neutralen Zuckern zwischen Zellkulturen und Geweben von *Daucus* und *Glycine* findet sich bei SASAKI et al. (1980).
Unterschiedliche Kulturbedingungen oder die Dauer der Subkultivierung können zu verschiedenen physiologischen Zuständen der Zellinien führen, die ebenfalls in der Zellwandzusammensetzung repräsentiert sind. Tab. 14 gibt einen Überblick über die neutralen Zucker der Polysaccharide (außer Cellulose) der Zellwände verschiedener Zellkulturen von *Daucus carota*; zusätzlich wurde die Arbeit von STEVENS und SELVENDRAN (1984) an Speicherwurzeln herangezogen.

Tab. 14: Zusammensetzung der Polysaccharide der Zellwand (außer Cellulose) aus neutralen Zuckern verschiedener Zellkulturen und Speicherwurzeln von *Daucus carota*

Monomer	DC_{b1}	STEVENS + SELVENDRAN (1984)	GOLDBACH +AMBERGER[1)] (1986)	SAZAKI (1983)	KONNO et al. (1986)
	wt %	wt %	mol %	wt %	wt %
Glucose	21	13,5	74,8	7,1	10,6
Galactose	18	39	9	25,9	19,4
Mannose	4	6,5	1,3	0,8	9,2
Xylose	8	6,5	3,0	21,3	10,0
Arabinose	32	25,5	10,8	37,3	39,0
Fucose	2	/	/	3,0	2,3
Rhamnose	6	/	/	4,9	10,0
Deoxy-hexose	n.d.	9	/	/	/

n.d.: nicht bestimmt.
1) Fraktionen NCA1 + NCA2 (mit Borsäure im Medium)

Die Unterschiede bestätigen die oben gemachten Aussagen, obwohl auch die etwas unterschiedliche Methodik zu den Unterschieden beitragen kann. Nicht berücksichtigt sind dabei die unterschiedlichen Mengen an Cellulose und Uronsäuren.
Insgesamt wird deutlich, daß auch bei Standardobjekten wie der Karotte nicht immer Literaturdaten herangezogen werden können, sondern daß die umfassende Charakterisierung der eigenen Zellinie anzustreben ist. Konkret gilt dies, wenn z.B. *in vitro*-Produkte aus Enzymtests in Beziehung zur Zellwand gesetzt werden sollen.
Weiterhin ist anzumerken, daß der hohe Anteil an Arabinose die Suche nach Enzymen, die diesen Zucker bei der Zellwandsynthese benutzen, aussichtsreich erscheinen läßt. Dabei muß die weitere Untersuchung der die Arabinose enthaltenden Polysaccharid-Bausteine auf Bindungstypen, Verzweigung und Polymerisationsgrad Hand in Hand gehen.
Die extrazellulären Polysaccharide weisen in der Zusammensetzung der neutralen Zucker gewisse Unterschiede zu den Zellwand-Polysacchariden auf: Xylose ist stärker vertreten, aber insbesondere Galactose nimmt einen größeren Anteil ein als Glucose und Arabinose. KATO et al. (1977) konnten aus dem Medium von Tabak-Suspensionskulturen ein Arabinogalactan isolieren; ebenso gelang die Darstellung eines Arabinoxylans aus Sojakulturen (KATO und MATSUDA, 1985). Über die Rolle der Arabinogalactan-Proteine im Medium wird noch zu berichten sein.
Die unterschiedliche Zuckerzusammensetzung der Zellwand macht sich ebenfalls bei der Fraktionierung in Pektin-Hemicellulose- und Cellulose-Fraktion bemerkbar. Tab. 15 zeigt einen Vergleich verschiedener Zellkulturen und Speicherwurzeln der Karotte.

GOLDBACH und AMBERGER (1986) beziffern den Cellulose-Gehalt der Zellwand ihrer Suspensionskultur von *Daucus carota* mit 7 - 12 %; dies verdeutlicht zusätzlich, wie groß allein bei Zellkulturen der gleichen Art die Bandbreite ist. Hier

Tab. 15: Fraktionen der Zellwand bei verschiedenen Zellkulturen und Speicherwurzeln von *Daucus carota* (in Prozent).

	DC_{b1} [1]	STEVENS+ SELVENDRAN (1984) [2]	MASUDA et al. (1984) [3]	ASAMIZU et al. (1983) [4]
Pektin	30	13,3	27	52,9
Hemicellulose	47	22,6	30	21,7
Cellulose	23	64,1	43	25,1

1) 5 Tage alte Suspensionszellen
2) Speicherwurzeln; die angegebenen Daten wurden wie folgt zusammengefaßt: Hot-water soluble + Hot-oxalate soluble: = Pektin; 1 M + 4 M KOH soluble:= Hemicellulose.
3) Die Prozentzahlen wurden aus den angegebenen Werten an Kohlenhydrat je Gramm Frischgewicht berechnet; 5 % und 24 % KOH lösliche Anteile zur Hemicellulose-Fraktion zusammengefaßt.
4) 6 Tage alte Suspensionszellen

spielen , wie bereits erwähnt, auch methodische Problem eine Rolle: Vor allem die Trennung von Pektinen und Hemicellulosen ist sehr stark abhängig von der angewendeten Technik. WILKIE (1985) summiert Pektine aufgrund dieser Ungenauigkeit in der Abgrenzung unter Hemicellulosen.

In der Regel werden die Pektine bei 80 - 100 °C mit EDTA oder Ammoniumoxalat (1 - 4 h) extrahiert. SELVENDRAN (1985) empfiehlt dagegen die Benutzung von CDTA, da sich dieser Komplexbildner bei Zimmertemperatur als effektiv erweist und so die Veränderung der Pektine durch erhöhte Temperatur vermieden wird. Nach FRY (1986) werden durch EDTA und Oxalat möglicherweise glycosidische Bindungen, Ester und Peptidbindungen hydrolysiert; er rät deshalb ebenfalls zur Anwendung von CDTA oder EGTA bei 20 °C.

Unterschiede in der Methodik können sich auch auf die Verteilung der Uronsäuren auf die Fraktionen auswirken. Bei der Zellinie DC_{b1} finden sich am 5. Tag 53 % in der Hemicellulose- und 43 % in der Pektin-Fraktion.

In der Zellkultur von ASAMIZU et al. (1983) finden sich 85 % der Uronsäuren in der Pektin-Fraktion, 15 % in der Hemicellulose-Fraktion; allerdings macht hier die Pektin-Fraktion fast 53 %, die Hemicellulose nur knapp 22 % aus. Entsprechend liegt bei dieser Kultur der Anteil an Uronsäuren an den gesamten Kohlenhydraten der Zellwand mit 21,7 % fast doppelt so hoch wie bei unserer Zellinie DC_{81} (12 %). Möglicherweise sind die Unterschiede in der Verteilung auf die Fraktionierung zurückzuführen, es gibt jedoch auch in den Hemicellulosen uronsäurehaltige Komponenten (DARVILL et al., 1980).
Der Wert für den Gehalt an Cellulose (23 %) ist in guter Übereinstimmung mit der Bestimmung nach UPDEGRAFF (1969), die im Rahmen der Kulturalterabhängigkeit durchgeführt wurde (25 %).
Eine gute Übereinstimmung ergibt sich beim Vergleich der unfraktionierten Zellwand und der Summe der Fraktionen; es scheint also im Verlauf der Fraktionierung kein Material verloren gegangen zu sein.
Schwierig sind Vergleiche der absoluten Menge an Kohlenhydraten der Zellwand in Bezug auf Frischgewicht oder Zellzahl, da in der Literatur häufig entsprechende Daten fehlen.

Eindeutig ist das Bild bei der Fraktionierung der extrazellulären Polysaccharide der Zellinie DC_{81}; es treten fast nur Pektine auf; zusammen mit der andersartigen Verteilung der neutralen Zucker kann von einem deutlichen Unterschied zur Zellwand gesprochen werden. Dabei ist nicht klar, ob einzelne Komponenten selektiv aus der der Zellwand verloren gehen oder ob gezielt Bausteine ins Medium abgegeben werden, die eine bislang unbekannte Funktion haben.

3. Untersuchungen zu Zellwand und extrazellulären Polysacchariden bei regenerierenden Protoplasten

Seit der ersten Isolierung mit Zellwand-abbauenden Enzymen

(COCKING, 1960) haben Protoplasten eine weite Verbreitung beim Studium der pflanzlichen Zelle gefunden. Protoplasten werden zur Isolierung von Zellorganellen benützt, stehen für Studien der Plasmamembran, für Aufnahme-Experimente oder genetische Manipulationen zur Verfügung (FOWKE und GAMBORG, 1980). Per se bieten sich Protoplasten für Experimente zur Zellwandregeneration an; vor allem elektronenmikroskopische Untersuchungen der Fibrillenbildung sind in Vielzahl durchgeführt worden. Diesen Experimenten steht eine kleinere Anzahl biochemischer Analysen gegenüber (Übersicht bei BURGESS, 1983; WILLISON und KLEIN, 1982; SEITZ et al., 1986). Es erfordert vergleichsweise viel Aufwand, um ausreichende Mengen an Zellwandmaterial für strukturelle Untersuchungen bereitzustellen; andererseits bietet die de *novo*-Bildung der Zellwand eine interessante Ausgangslage. Auch die häufig aberrante Zusammensetzung im Vergleich zum Ausgangsmaterial ist nicht negativ zu bewerten. Sollte die Zellwand eine einfachere Struktur besitzen, könnte dies bei der Erforschung der an der Synthese beteiligten Enzyme eher hilfreich sein.

Die Protoplasten der Zellinie DC_{81} regenerieren ähnlich schnell eine Zellwand wie Tabak-Protoplasten (BLASCHEK et al., 1981); die absoluten Mengen an Zellwandmaterial und extrazellulären Polysacchariden sind sehr ähnlich.

Der Gehalt an Cellulose ist mit maximal 13 % etwa halb so hoch wie bei den 5 Tage alten Suspenionszellen. Dieses Merkmal wurde auch bei regenerierenden Protoplasten von Soja (KLEIN et al., 1981), *Vinca rosea* (TAKEUCHI und KOMAMINE, 1981) und Mais (PILET et al., 1984) gefunden. LANGEBARTELS (1981) konnte bei regenerierenden Protoplasten unserer Suspensionkultur einen steigenden Einbau von [^{14}C]Glucose in säureunlösliches Material (UPDEGRAFF, 1969) über 70 h verfolgen. Legt man einen mittleren Wert von 1000 cpm zugrunde, so kann man für einen Zeitraum von 4 Tagen eine Menge von etwa 30 µg Cellulose kalkulieren; dies stimmt mit dem auf völlig andere Weise gewonnenen Wert von 40 µg sehr

gut überein.
Regenerierende Protoplasten erscheinen damit nicht als geeignetes System, um die Synthese von Cellulose zu klären. Dennoch wurden, neben vielen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Fibrillen-Bildung, Experimente zum Polymerisationsgrad der Cellulose an regenerierenden Protoplasten von Tabak (BLASCHEK et al., 1982) und Karotte (ASAMIZU et al., 1977) durchgeführt. Elektronenmikroskopisch konnten die bei höheren Pflanzen gefundenen "Rosetten", die für die Synthese zuständig sein sollen, nicht nachgewiesen werden; bei *Daucus* finden sich globuläre Partikel am Ende der Eindrücke von Fibrillen in die Plasmamembran (BROWN et al., 1983).
Der Gehalt an Uronsäuren ist in der Zellwand regenerierender Protoplasten unserer Karotte mit bis zu 36 % deutlich höher als bei Suspensionszellen. Dieser Wert liegt höher als bei anderen Objekten; bei Mais (PILET et al., 1984) wurden lediglich 3,8 %, bei *Vinca* bis 9 % (TAKEUCHI und KOMAMINE, 1978b) gefunden.
Bemerkenswert konstant ist die Zusammensetzung der Zellwand aus neutralen Zuckern. Der hohe Anteil an Mannose neben Glucose deutet möglicherweise auf ein Glucomannan hin; eine Verbindung mit *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten bei Suspensionszellen (INGOLD, 1985) kann vermutet werden.
Die Anteile der neutralen Zucker variieren bei verschiedenen Objekten beträchtlich. So finden sich bei Tabak (BLASCHEK et al., 1981) und bei *Vinca* (TAKEUCHI und KOMAMINE, 1978b) überwiegend Glucose, bei Mais (PILET et al., 1984) Xylose und Mannose als dominierende Zucker.
Die Werte können bei der gleichen Art stark schwanken. HANKE und NORTHCOTE (1974) fanden bei Soja über 90 % Glucose, KLEIN et al. (1981) dagegen Arabinose, Mannose und Glucose mit etwa gleichen Prozentsätzen um 25 %. Auch für die regenerierte Zellwand bei Karotten wurde eine Zusammensetzung aus hauptsächlich Glucose und Galactose berichtet (ASAMIZU und NISHI, 1980). Dies belegt die bereits bei der Zusammen-

setzung der Zellwand von Suspensionszellen getroffene Aussage erneut: Die Kulturen einer Art können beträchtliche Unterschiede aufweisen.
Eine größere Ausgewogenheit hinsichtlich der Zuckerzusammensetzung zeigen die extrazellulären Polysaccharide; dies gilt ebenfalls für die eben zitierten Objekte, bei denen gleichfalls Glucose in der Zellwand dominierte. Erstaunlich ist, daß dabei die Anteile der Zucker - im Gegensatz zur Zellwand - im Verlauf der Regeneration variieren.
Die Fraktionierung der von regenerierenden Protoplasten gebildeten Zellwand bestätigt den mit der Methode nach UPDEGRAFF (1969) gefundenen niedrigen Werte für Cellulose; im Vergleich mit 5 Tage alten Suspensionszellen findet sich ein hoher Anteil an Pektinen, der wahrscheinlich mit dem erhöhten Wert für Uronsäuren in Beziehung steht.
In flüssigem Medium gehaltene Protoplasten bieten ebenso wie Zellkulturen die Möglichkeit, Wirkstoffe zu applizieren. Dabei wurden häufig Hemmstoffe der Zellwandsynthese oder der Mitose benutzt (Übersicht bei MEYER und HERTH, 1982). Interessant wäre es jedoch, Substanzen zu finden, die die Synthese der Polysaccharide steigern oder die Zusammensetzung der Zellwand verändern. So wurde eine Steigerung der Synthese durch das Phytotoxin Victorin bei Hafer-Protoplasten beobachtet (WALTON und EARLE, 1985).
Die Anwendung von DMSO auf die Bildung von Calli bei *Hibiscus* wurde bereits unter III.3. ausführlich erwähnt. Bei Protoplasten der Karotte konnte allerdings während der ersten 3 Tage der Regeneration kein signifikanter Effekt festgestellt werden; die Steigerung der Menge am 4. Tag ist deutlich, aber möglicherweise auf die Lyse eines Teils der Zellen zurückzuführen.
Einen veränderten Ansatz böte die Zugabe von DMSO bei der Isolierung der Protoplasten. Zum einen wären die Protoplasten nur während einer kurzen Phase diesem Agens ausgesetzt; zum anderen ändert sich während der Inkubation mit abbauenden Enzymen die Orientierung von Mikrotubuli in den

Zellen (LLOYD et al., 1980). Es ist ein stabilisierender Einfluß von DMSO denkbar, der sich auf die anschließende Regeneration der Zellwand auswirken könnte.

4. Hydroxyprolinhaltige Glycoproteine der Zellwand und des Kulturfiltrates

LAMPORT und NORTHCOTE (1960) sowie DOUGALL und SHIMBAYASHI (1960) berichteten erstmals über das Vorkommen von Hydroxyprolin in der Zellwand; das entsprechenden Glycoprotein wurde später Extensin genannt (LAMPORT, 1965). Obwohl es viele Hinweise für eine Rolle als strukturelle Komponente gibt, werden auch andere Funktionen in Betracht gezogen (WILSON und FRY, 1986). Bei Suspensionszellen der Bohne , die mit einem Elicitor aus der Zellwand des Pilzes *Colletotrichum lindemuthianum* inkubiert wurden, ist der Hydroxyprolin-Gehalt in der Zellwand deutlich erhöht (BOLWELL et al., 1985c). Völlig ungeklärt ist dagegen die Rolle der ebenfalls hydroxyprolinhaltigen Arabinogalactan-Proteine.
Hier bietet sich die Möglichkeit, die jeweilige Menge an Glycoprotein und die Verknüpfung mit dem Polysaccharid-Anteil der Zellwand oder des Mediums mit dem physiologischen Zustand, mit Wachstumsparametern etc. in Beziehung zu setzen. CASSAB et al. (1985) konnten zeigen, daß in Samenschalen von Soja der Gehalt an Hydroxyprolin gewebespezifisch und vom Entwicklungszustand abhängig reguliert wird.
Über die Rolle von Extensin oder Arabinogalactan-Proteinen bei der Regeneration von Protoplasten ist noch wenig bekannt. Wenn 3,4-dehydro-L-Prolin, ein Hemmstoff der Prolyl Hydroxylase (COOPER und VARNER, 1983a), zum Medium von Protoplasten gegeben wird, teilen sich die Zellen nicht und bilden keine Calli. Vermutlicht wird keine neue Wand gebildet (COOPER, 1984).

Regenerierende Protoplasten der Zellinie DC_{81} haben am 4. Tag einen höheren Gehalt an Hydroxyprolin in der Zellwand und im Medium als Suspensionszellen (5. Tag). VAN HOLST und VARNER (1984) konnten zeigen, daß die mit Salz eluierbaren "precursor" des Extensins bei der Karotte einen Proteinanteil von 35 % haben; davon sind 45 % Hydroxyprolin. Zieht man diese Daten zu Hilfe, so läßt sich der Extensin-Gehalt in der Zellwand von Suspensionszellen mit etwa 0,7 %, bei regenerierenden Protoplasten mit ca. 2 % beziffern. Insgesamt ist die Menge an Hydroxyprolin in der Zellwand der Zellinie DC_{81} geringer als in vielen anderen Gewebekulturen (vgl. LAMPORT, 1965). TALMADGE et al. (1973) fanden bei einer Suspensionskultur von *Acer pseudoplatanus* 2,0 % Hydroxyprolin in der Zellwand, die damit einen wesentlich höheren Anteil an Extensin aufweist. Bei Zellkulturen von *Phaseolus* beträgt die Menge etwa 100 µg je Gramm Frischgewicht (BOLWELL et al., 1985c). Im Phloemparenchym der Karotte wurden 21 - 43 µg gemessen (CHRISPEELS, 1969; BRYSK und CHRISPEELS, 1971); diese Werte sind den von mir gefundenen sehr ähnlich. Möglicherweise ist die Menge an Hydroxyprolin nach dem Ende der logarithmischen Phase der Kultur höher.

Sowohl bei Suspensionszellen als auch bei regenerierenden Protoplasten liegt die Menge an Hydroxyprolin in der ganzen Zelle höher als in der Zellwand alleine; dazu können sowohl Vorstufen des Extensins als auch der Arabinogalactan-Proteine beitragen. Arabinogalactan-Proteine wurden in Zellen von *Lolium multiflorum* (ANDERSON et al., 1977) und Bohnen (SAMSON et al., 1983) nachgewiesen. Vorstufen des Extensins wurden im Golgi-Apparat von Suspensionszellen des Tabaks gefunden (KAWASAKI und SATO, 1979).

Deutliche Unterschiede zeigen die Glycoproteine des Kulturmediums von regenerierenden Protoplasten und Suspensionszellen. Mit Hilfe des ß-Galactosyl-Yariv-Reagenzes läßt sich aus dem Kulturfiltrat bei Suspensionszellen fast 70 % des Hydroxyprolins sedimentieren, bei Protoplasten lediglich

20 %. Dies deutet darauf hin, daß die hydroxyprolinreichen Glycoproteine im Medium von Suspensionszellen überwiegend Arabinogalactan-Proteine sind. Im Medium der Protoplasten könnten die verbliebenen 80 % des Hydroxyprolins in "precursor"-Molekülen des Extensins enthalten sein, obwohl die Polysaccharide viel Arabinose und Galactose enthalten.
Arabinogalactan-Proteine wurden ebenfalls im Medium von Tabak- (AKIYAMA und KATO, 1981) und *Lolium*-Zellkulturen (ANDERSON et al., 1981) nachgewiesen. Bei *Acer pseudoplatanus* wurden die Glycoproteine des Mediums zunächst für Vorstufen des Extensins gehalten (KEEGSTRA et al., 1973). Es handelt sich aber hauptsächlich um Arabinogalactan-Proteine (POPE, 1977).
Ein zusätzlicher Nachweis kann durch isoelektrische Fokussierung erbracht werden, da sich beide Glycoproteine im isoelektrischen Punkt deutlich unterscheiden. Zudem lassen sich Arabinogalactan-Proteine nach der isoelektrischen Fokussierung mit dem Yariv-Reagenz anfärben (SAMSON et al., 1984). Diese Methodik könnte benutzt werden, um zu klären, ob im Medium der Protoplasten wirklich "precursor"-Moleküle des Extensins vorliegen, oder ob das verwendete Yariv-Reagenz weitere vorhandene Arabinogalactan-Proteine nicht präzipitieren konnte. Zum Vergleich könnten auch die (das) aus der Zellwand extrahierbare Glycoprtein(e) dieser Technik unterworfen werden, obwohl das Extraktionsverhalten eindeutig auf Extensin hinweist. Ein Teil des hydroxyprolinhaltigen Materials ist mit Salz eluierbar (BRYSK und CHRISPEELS, 1971; COOPER und VARNER, 1983b; SMITH et al., 1984; STAFSTROM und STAEHELIN, 1986a), ein größerer Anteil erst nach Lösen der Diphenylether-Bindungen der Tyrosin-Moleküle (SELVENDRAN et al., 1975; O'NEILL und SELVENDRAN, 1980).

B) Trennung von Membranen aus Suspensionszellen und Protoplasten von *Daucus carota*

1. Trennung von Membranen über lineare Gradienten

Zentrifugationen mit linearen Dichtegradienten stellen bislang eine bevorzugte Methode dar, um subzelluläre Strukturen zu trennen und spezifisch anzureichern. Die Lokalisierung und Identifizierung der betreffenden Komponenten geschieht dabei häufig mit Leitenzymen, oft verbunden mit elektronenmikroskopischen Techniken (QUAIL, 1979). Dabei können einige Organellen relativ klar identifiziert werden, z.B. Mitochondrien. Schwierigkeiten bereitet häufig die Zuordnung von ER, Golgi-Apparat und Plasmamembran. Zum einen ist die Dichte der Membranen von vielen Faktoren abhängig; nicht nur das verwendete Objekt, sondern auch die Präparationstechnik spielen eine große Rolle. Zum anderen hängt die Zuordnung auch von der Zuverlässigkeit der verwendeten Leitenzyme ab; ein Enzym muß nicht ausschließlich in einem Kompartiment lokalisiert sein. Vor allem beim ER finden sich Populationen von Membranen mit unterschiedlicher Dichte. Auch der Golgi-Apparat ist in ein "cis-face" und ein "trans-face" eingeteilt; diese Teilkompartimente können sich in der Enzymausstattung unterscheiden (ROTHMAN, 1981)
Glucansynthase II wird oft als Leitenzym für die Plasmamembran herangezogen. In linearen Gradienten findet sich jedoch auch häufig meßbare Aktivität im dem Bereich, der dem Golgi-Apparat zugeschrieben wird. Bei Zuckerrohr fanden sich sowohl für Glucansynthase I als auch II zwei Gipfel; die jeweiligen "peaks" beider Enzyme bei niedriger und höherer Dichte stimmten dabei nicht genau überein (ROBINSON und GLAS, 1983). ATPase (Plasmamembran) war mit einem Gipfel bei der höheren Dichte meßbar; IDPase (Golgi-Apparat) zeigte eine breite Verteilung, die die Gipfel niedriger Dichte der beiden Glucansynthasen einschloß. Glucansynthase I-Aktivität ist möglicherweise nicht nur im Golgi-Apparat lokalisiert,

sondern auch in "coated vesicles" (GRIFFING et al., 1986). Dies zeigt wiederum, welche Schwierigkeiten im jeweiligen Fall bei der Identifizierung der Membranfraktionen auftreten können. KCl-stimulierbare, Mg^{2+}-abhängige ATPase findet sich nicht nur am Plasmalemma, sondern wurde inzwischen auch am Golgi-Apparat nachgewiesen (CHANSON et al., 1984; CHANSON und TAIZ, 1985; ALI und AKAZAWA, 1986). Sie unterscheidet sich aber von der dem Plasmalemma zugeordneten Aktivität im pH-Optimum und reagiert nicht sensitiv auf Vanadat (CHANSON und TAIZ, 1985; ALI und AKAZAWA, 1986).

Bei den Protoplasten der Karotte war zunächst die nahezu völlige Übereinstimmung der Leitenzyme des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas ebenso auffallend wie die daraus resultierende Dichte der Plasmamembran von etwa 1,12 g/ml. Es konnte gezeigt werden, daß die Verteilung nicht mit dem angewendeten Trennsystem zusammenhängt, da die Membranen aus Suspensionszellen deutlich zwei Gipfel mit Golgi-Apparat und Plasmamembran zeigen. Dabei hatte die Steroyl-Glucosyltransferase ein schärferes Maximum als das zweite Leitenzym für die Plasmamembran, die Glucansynthase II.

Eine Übereinstimmung von Markern des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas (mit einer Dichte von 1,14 g/ml) fanden auch GALBRAITH und NORTHCOTE (1977) bei Protoplasten aus Soja. Dabei wurde radioaktive, diazotisierte Sulfanilsäure als externer Marker benutzt. In einer weiteren Arbeit aus diesem Labor (CHADWICK und NORTHCOTE, 1980) wurde beim gleichen Objekt eine Dichte von 1,13 g/ml für die Membranen des Golgi-Apparates und von 1,15 g/ml für die des Plasmalemmas angegeben. Dieses letzte Resultat ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von GRIFFING et al. (1986). PERLIN und SPANSWICK (1980) fanden bei Protoplasten aus Mais das Maximum der ATPase bei einer Dichte von 1,16 g/ml in Übereinstimmung mit einem externen Marker (ebenfalls radioaktiv markierte Sulfanilsäure).

Auch die Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration führte nicht zu einer Trennung der Leitenzyme des Golgi-Apparates und des

Plasmalemmas. Im gleichen Experiment wurde die Zentrifugationsdauer auf 15 h erhöht, um sicherzustellen, daß isopyknische Bedingungen erreicht waren. Eine Verschiebung der Dichte der Plasmamembran durch eine Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration im Gradienten konnten ROBINSON et al. (1981) bei *Pisum sativum*, *Daucus carota* und *Cucurbita maxima* nachweisen. Im Falle der Karotte wurde dabei Phloemparenchym benutzt. Es ist bemerkenswert, daß bei niedriger Mg^{2+}-Konzentration (0,1 mM) im Gradientenmedium die Leitenzyme des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas ebenfalls übereinstimmten.

Eine andere Erklärung für die vergleichsweise geringe Dichte der Plasmamembran könnte auch in der Präparationstechnik für Protoplasten liegen. Die dabei verwendeten zellwandabbauenden Enzympräparationen enthalten ebenfalls Proteasen. Damit könnte ein Verlust an Proteinen in der Plasmamembran eintreten, der für die Dichteänderung verantwortlich ist. VAN DER VALK (1984) zeigte, daß durch eine kurze Erwärmung der Enzymlösung diese Proteasen in ihrer Aktivität drastisch reduziert werden, ohne daß die anschließende Isolierung der Protoplasten darunter leidet. Bei den Protoplasten der Karotte führte diese Behandlung zu einer etwas deutlicheren Ausprägung der Glucansynthase II-Aktivität im Gradienten; auch bei der Kontrolle war jedoch eine Schulter bei 33 % (w/w) Saccharose zu erkennen; dies ist wohl auf die bei diesem Experiment angewandte Kurzzeitisolierung zurückzuführen.

Eine deutliche Trennung mit zwei gleich ausgeprägten Maxima der Leitenzyme des Plasmalemmas findet sich erst, nachdem dem Inkubationsmedium (ebenfalls erwärmt) zusätzlich BSA zugesetzt wird. Im Gegensatz zu den Suspensionszellen zeigt dabei auch die Steroyl-Glucosyltransferase eine zweigipfelige Verteilung im Gradienten. Das zweite Maximum liegt auch bei höherer Dichte (38 % Saccharose). Die Zugabe von BSA ins Inkubationsmedium ist also bei weiteren Experimenten anzuraten. Möglicherweise könnte auch durch Zugabe von Proteinase-Inhibitoren eine weitere Änderung des Verteilungsmusters der

Leitenzyme des Plasmamlemmas im Gradienten erzielt werden. In Abb. 38 ist bei den mit "microbeads" behandelten Protoplasten der erste Gipfel ebenfalls reduziert, sodaß zumindest ein Teil der Aktivitäten von Glucansynthase II und Steroyl-Glucosyltransferase in diesem Bereich nicht dem Golgi-Apparat, sondern dem Plasmalemma zugeschrieben werden muß.

Diese Ergebnisse könnten auch für die Regeneration von Protoplasten von Bedeutung sein. Zwar sind die Protoplasten nach der Isolierung vital, das Plasmalemma als Barriere ist intakt. Vielleicht kann aber durch die Reduzierung der Protease-Aktivität die "lag"-Phase der Regeneration verkürzt werden.

BOSS und RUESINK (1979) benutzten Gradienten mit Renografin als Medium, um Protoplasten mit radioaktivem Concanavalin A markieren zu können. Damit konnte das Plasmalemma mit einer Dichte von 1,14 g/ml in der Gipfelfraktion unabhängig von Leitenzymen nachgewiesen werden. Saccharose kann in diesem Fall nicht verwendet werden, weil sonst das gebundene Concanavalin A wieder abgelöst wird. Versuche mit Urografin führten bei unseren Protoplasten nicht zu ähnlichen Resultaten, obwohl auch die erwähnten Autoren mit *Daucus carota* arbeiteten. Zunächst fand sich die Aktivität der Steroyl-Glucosyltransferase bei wesentlich geringerer Dichte; die Glucansynthase II wurde durch Urografin stark gehemmt. Mit Metrizamid als Gradientenmedium war die Glucansynthase II gut meßbar, fand sich aber ebenso wie die SGT in Urografin-Gradienten bei geringer Dichte (1,065 g/ml). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Arbeiten von JACOBS und HERTL (1980), HERTL et al. (1980) und DE LUCA et al. (1984) bei *Cucurbita pepo* sowie RASI-CALDOGNO et al. (1982) bei Erbsen; in allen Fällen wiesen die "Marker" für das Plasmalemma Maxima bei vergleichsweise geringer Dichte in den Metrizamid-Gradienten auf.

Eine Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Anreicherung des Plasmalemmas erfolgt zusammen mit der Diskussion der

"microbeads"-Methodik.

Abschließend sollen noch einige vergleichende Betrachtungen zur Dichte der Plasmamembran angestellt werden. Zunächst muß herausgehoben werden, daß die Dichte der Plasmamembran den physiologischen Bedingungen angepaßt wird. POOLE et al. (1984) fanden bei Speichergewebe von Roter Beete die Plasmamembran bei 30 % oder 38 - 40 % (w/w) Saccharose im Gradienten, je nachdem ob die Speicherwurzeln 1 - 6 Monate gelagert oder sofort verwendet wurden. Das Verhalten des Plasmalemmas bei osmotischer Kontraktion von Protoplasten ändert sich mit den Bedingungen, unter denen das Ausgangsmaterial kultiviert wurde (GORDON-KAMM und STEPONKUS, 1984a,b). Waren die Pflanzen an Kälte akklimatisiert worden, bildeten sich bei osmotischer Kontraktion der Protoplasten lipidreiche "Knöpfchen" an der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Dieser wurden bei anschließender Ausdehnung der Protoplasten wieder integriert. Waren die Pflanzen jedoch nicht unter Kältebedingungen angezogen, erfolgte bei Kontraktion eine Anhäufung von Vesikeln in der Zelle, die bei darauf folgender Expansion nicht wieder ins Plasmalemma eingegliedert wurden; die Protoplasten lysierten.

2. Trennung der Membranen mit Hilfe von "microbeads"

2.1. Belege für die Wirksamkeit der "microbeads" und Optimierung der Methodik

SCHMIDT et al. (1983) und CHANEY und JACOBSON (1983) berichteten erstmals über die Reinigung von Plasmamembranen aus Protoplasten mit Hilfe von "microbeads" (Durchmesser 10 - 50 nm, Dichte 2,5 g/ml). Zuvor waren schon "beads" benutzt worden, die in der Größe den verwendeten Protoplasten glichen (JACOBSON, 1977). Sowohl "beads" wie auch "microbeads" sind positiv geladen und können an negative Ladungen der Oberfläche der Protoplasten binden. Versuche in unserem

Labor mit "beads", deren Oberfläche mit Poly-Lysin behaftet und damit ebenfalls positiv geladen war, führten meist zu einem Zerreißen der Protoplasten vor der osmotischen Lyse und zu Aggregationen; dies beruhte darauf, daß die Protoplasten mit den etwa gleich großen "beads" Ketten bildeten und so starken mechanischen Kräften ausgesetzt waren. Da die neu entwickelten "microbeads" wesentlich kleiner als die Protoplasten sind, schien dieses Problem aufgrund der geometrischen Gegebenheiten nicht zu bestehen. Es mußten jedoch Kriterien entwickelt werden, um die Wirksamkeit dieser neu entwickelten Methode auch bei den Protoplasten der Karotte sicher belegen zu können.

Aufgrund der hohen Dichte der "microbeads" und der bei der Lyse auftretenden "sheets" (SCHMIDT et al., 1983; CHANEY und JACOBSON, 1983; POLONENKO und MACLACHLAN, 1984) sollte bei niedertouriger differentieller Zentrifugation des Lysates eine Anreicherung des Plasmalemmas im Sediment erfolgen. Ebenso sollte sich aufgrund der höheren Dichte die Verteilung der Plasmamembram bei der Zentrifugation des Lysates über Stufengradienten oder lineare Gradienten aus Saccharose ändern. Nachdem das Plasmalemma durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt ist, sollten sich die verbliebenen Endomembranen auf linearen Gradienten mit zumindest verminderten Anteilen des Plasmalemmas auftrennen lassen.

Als Leitenzym für die Plasmamembran wurde zunächst die KCl-stimulierbare, Mg^{2+}-abhängige ATPase verwendet. Es ist jedoch aus den linearen Gradienten zu ersehen, daß bei unbehandelten Protoplasten diese Aktivität mit mehreren Maxima vertreten ist. ATPasen finden sich auch am Golgi-Apparat und am Tonoplasten. Unspezifische Phosphatasen können ebenfalls ATP als Substrat verwenden. Dieser Anteil wird jedoch durch Molybdat im Testpuffer herabgesetzt. Als spezifisch für die Plasmamembran gilt der Anteil der ATPase, der durch Vanadat gehemmt werden kann. Dieser Hemmeffekt konnte mittlerweile an solubilisierten und gereinigten ATPase-Präparationen bestätigt werden (REA und POOLE, 1986). Bei der Optimierung

der Methodik wurde jedoch auf die regelmäßige Untersuchung der Vanadat-Hemmbarkeit verzichtet; es zeigte sich, daß meist 70 % der ATPase-Aktivität sedimentierten, ohne daß sich bei der Anwendung der "microbeads" das Verteilungsmuster anderer Leitenzyme veränderte. Berücksichtigt man die Sedimentation von unlysierten Protoplasten und aggregiertem Material mit etwa 40 %, so sind von den verbliebenen 60 % etwa die Hälfte sedimentiert; legt man weiterhin zugrunde, daß nur ein Teil der gemessenen ATPase-Aktivität am Plasmalemma lokalisiert ist, so sollte der Anteil sedimentierter Plasmamembran über 50 % liegen.

Diese Schlußfogerung konnte durch die Verteilung der GT II U, dem zweiten Leitenzym für das Plasmalemma, bestätigt werden. Hier lagen bei mit "microbeads" behandelten Protoplasten die Prozentwerte des mit einfacher Zentrifugation sedimentierbaren Anteils in vielen Fällen über 70 %. Auch hier ist jedoch zu sagen, daß mit dem Testansatz der GT II U bei linearen Gradienten Aktivität in Fraktionen gefunden wird, die Vesikel des Golgi-Apparates enthalten. So kann auch die Messung der GT II U nicht zur exakten Quantifizierung des Prozentsatzes an sedimentierter Plasmamembran herangezogen werden.

Die berichteten Schwierigkeiten bei den Experimenten mit Concanavalin A als externem Marker lassen ebenfalls keine genaue Abschätzung zu, umso mehr, als diese Versuche unter veränderten Bedingungen durchgeführt werden müssen, da Saccharose gebundenes Concanavalin A wieder ablöst. Immerhin läßt sich sagen, daß ein Teil der gemessenen Radioaktivität des niedertourigen Überstandes bei höherer Zentrifugationsbeschleunigung sedimentiert wird; es kann sich dabei auch um in Vesikel eingeschlossenes, nicht gebundenes oder wieder losgelöstes Concanavalin A handeln.

Insgesamt sprechen alle Belege zumindest qualitativ für die Wirksamkeit der "microbeads":

- die Plasmamembran kann selektiv angereichert werden
- die anderen Membranen und Organellen der Zellen können,

nachdem die Plasmamembran durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert wurde, im linearen Gradienten aufgetrennt werden.

Die ursprüngliche Methodik, wie sie von SCHMIDT et al. (1983) für Protoplasten von *Saccharomyces cerevisiae* erarbeitet worden war, mußte dazu geändert werden. Vor allem die Menge an Polyacrylsäure, die nach dem Anheften der "microbeads" zur Neutralisation überschüssiger Ladungen und zur Quervernetzung benutzt wird, mußte drastisch erhöht werden. Ebenso erwies es sich als günstig, das Anheften der "microbeads" und die anschließende Behandlung mit Polyacrylsäure ohne dazwischenliegende Sedimentation der Protoplasten durchzuführen. Diese Änderung der Arbeitsweise wurde mittlerweile auch bei der Isolierung der Plasmamembran aus Protoplasten von *Beta vulgaris* berichtet (WASSERMAN et al., 1984).

Ohne nachteilige Wirkung konnten auch die Schritte beim Anheften der "microbeads" mit dem normalen, zweiwertige Ionen enthaltenden Medium PI-3 durchgeführt werden.

2.2. Reinigung der Plasmamembran mit Hilfe der "microbeads"-Technik

Die selektive Anreicherung der Plasmamembran im Sediment bei einfacher Zentrifugation bildete den Ausgangspunkt für die weitere Reinigung. Schon dabei zeigte sich, daß aufgrund unlysierter Protoplasten oder aggregierten Materials, das auch bei Protoplasten ohne "microbeads" auftritt, die spezifische Aktivität der verwendeten Marker nur gering anstieg. Deshalb wurden verschiedene Verfahren untersucht, um diesen unerwünschten Proteinanteil drastisch zu reduzieren.

Wiederholtes Zentrifugieren und Resuspendieren des Sedimentes führten dabei nicht zum gewünschten Erfolg. Auch die Zentrifugation des Lysates über lineare oder Stufengradienten führt nicht grundsätzlich zu einer Trennung, da nicht nur die "sheets" der Plasmamembran, sondern auch große Pro-

toplasten-Fragmente oder unlysierte Protoplasten mit "microbeads" behaftet sind und somit eine höhere Dichte aufweisen. Dies zeigte sich anhand der Protein-Werte sehr deutlich bei der Zentrifugation des Lysates über Stufengradienten. Analysiert man die Gradienten genauer, so zeigt sich, daß ein Teil der Kontamination ausgewaschen werden kann. Variiert man die Beschleunigung bei kurzer Zentrifugationsdauer, findet man, daß die größeren Protoplasten-Fragmente schneller sedimentieren als die "sheets" der Plasmamembran; dies wird durch die Übereinstimmung der prozentualen Werte für Protein und Leitenzyme im Sediment deutlich (Abb. 41). Auf diese Weise läßt sich eine Anreicherung der GT II U um den Faktor 7 erzielen.

Eine Unterstützung der osmotischen Lyse durch Ultraschall oder mit Hilfe einer Parr-Bombe führt zu einer etwas höheren spezifischen Aktivität der GT II U im niedertourigen Sediment; das Problem der Kontamination mit aggregiertem Material wird jedoch nicht grundsätzlich gelöst.

Als beste Möglichkeit, Aggregate oder große Bruchstücke von Protoplasten zu entfernen, wurde schließlich folgende Methode gefunden: Man erhöht nach der Lyse die Saccharose-Konzentration des Lysates und zentrifugiert bei 100 g. Dabei sedimentieren vor allem die großen Bruchstücke. Aus dem Überstand kann die Plasmamembran sedimentiert und anschließend auf einem linearen Gradienten weiter gereinigt werden. Auf diese Weise gelangt man zu einer zehnfachen Anreicherung der GT II U. Bei diesem Experiment wurde der Zeitbedarf für die Zentrifugation über den linearen Gradienten nicht optimiert. Nach den geschilderten Experimenten mit niedertouriger Zentrifugation sind die mit "microbeads" behafteten "sheets" der Plasmamembran jedoch sehr rasch im Sediment zu finden. Um das Verhalten der ausgewaschenen Membranen zu untersuchen, wurden isopyknische Bedingungen angestrebt. Wenn man eine rasche Präparation der Plasmamembran wünscht, könnte die Zentrifugationsdauer drastisch reduziert werden.

Die Methode, mit "microbeads" eine angereicherte Plasmamembran-Fraktion zu gewinnen, wurde zunächst an Hefe und *Dictyostelium* erprobt. SCHMIDT et al. (1983) fanden bei Hefe eine zwölffache Anreicherung der Plasmamembran, bei *Dictyostelium* wurden Faktoren von 10 - 17 angegeben (CHANEY und JACOBSON, 1983). Die Arbeitsgruppe von Dr. Jacobson übertrug die Methode auch auf höhere Pflanzen. Bei Protoplasten von *Beta vulgaris* wurde aber lediglich eine etwa 4fache Anreicherung der Plasmamembran erreicht (WASSERMANN et al., 1984). Obwohl die Leitenzyme anderer Kompartimente gut ausgewaschen wurden, fanden sich noch 28 % des ursprünglichen Proteins in der Präparation. Offensichtlich liegen hier ebenfalls Kontaminationen aus Aggregaten und großen Protoplasten-Bruchstücken vor; die Autoren wandten die hier ebenfalls beschriebenen Versuche mit einem gestuften Gradienten an, ohne die Aggregate vorher abzutrennen.

Eine weitere Arbeit über die "microbeads"-Methode wurde von POLONENKO und MACLACHLAN (1984) veröffentlicht; die Autoren benutzten Protoplasten der Erbse. Auch hier war die Präparation der Plasmamembran frei von enzymatischen Aktivitäten anderer Membranen, die Enzyme des Plasmalemmas jedoch nur 2 - 3fach angereichert. Leider geben diese Autoren keine Prozentwerte für Protein an, so daß ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Die geringe Erhöhung der spezifischen Aktivitäten von Glucansynthase und ATPase lassen jedoch eine Verunreinigung der Präparation der Plasmamembran mit unerwünschten Proteinen vermuten.

2.3. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Trennung der Membranen

Ein Vergleich der Faktoren der Anreicherung von GT II U gegenüber Protein und Enzymen ist in Tab. 16 zusammengestellt.

Tab. 16: Anreicherung der GT II U gegenüber Protein und Enzymen bei verschiedenen Methoden der Membrantrennung

Methode:	lineare Saccharose-Gradienten		"microbeads"-Methodik
Material:	Suspensionszellen	Protoplasten	Protoplasten
Anreicherung gegenüber:			
Protein	7,0	3,3	10,0
GT I U	2,5	-	-
IDPase	2,1	-	-
GT I G	-	3,4	2,3
CCO	3,8	-	2,1

Die beste Anreicherung der GT II U hinsichtlich des Proteins findet sich bei der "microbeads"-Methode. Hier ist ebenfalls die Ausbeute mit 17 % am besten. Die Kontamination durch andere Enzymaktivitäten ist nicht wesentlich höher als bei linearen Gradienten.
Die Anreicherung der GT II U aus Suspensionszellen in linearen Gradienten ist mit den Ergebnissen von INGOLD (1985) vergleichbar; er fand eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 3 - 6.
Da bislang nur wenige Berichte über die Anwendung der "microbeads" zur Isolierung der Plasmamembran vorliegen, kann kein endgültiges Urteil über die Zukunft dieser Methodik gefällt werden. Möglicherweise kann die Reinheit der

Präparationen weiter verbessert werden. Ein Vorteil ist der geringere Zeitbedarf und geringere Arbeitsaufwand im Vergleich zu linearen Gradienten; die Methode kann allerdings nur bei Protoplasten angewendet werden. Dies ist ein Nachteil im Vergleich zu der in letzter Zeit verstärkt benutzten Technik der "phase-partition". Hier werden ebenfalls in relativ kurzer Zeit Präparationen der Plasmamembran erzielt. Die Anreicherung der "Marker" des Plasmalemmas aus mikrosomalen Sedimenten betrug 7 für Spinat und 16 bei Gerste (KJELLBOM und LARSSON, 1984). In Einzelfällen müssen die Membranen der PEG-Phase zusätzlich in einem linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt werden, um eine befriedigende Reinheit der Plasmamembran zu erzielen, z.B. bei *Vigna radiata* (YOSHIDA et al., 1986).

2.4. Spezifische Aktivitäten der Glucansynthase II in Rohhomogenaten der Zellinie DC_{81}

Die absoluten Aktivitäten der GT II U liegen bei Protoplasten im Durchschnitt niedriger als bei Suspensionszellen. INGOLD (1985) gibt spezifische Aktivitäten von 850 bis 2000 pMol * (min Testzeit)$^{-1}$ * (mg Protein)$^{-1}$ bei Suspensionszellen der Zellinie DC_{81} an. Im Vergleich betrug der Wert im Experiment der Abb. 27 1221 pMol*(min Testzeit)$^{-1}$ * (mg Protein)$^{-1}$. Bei Rohhomogenaten von Protoplasten wurden Werte zwischen 712 und 1625 pMol*(min Testzeit)$^{-1}$ * (mg Protein)$^{-1}$ bei einem durchschnittlichen Wert von 999 pMol * (min Testzeit)$^{-1}$*(mg Protein)$^{-1}$ gemessen. Dabei ist ein Unterschied zwischen Kurzzeit- und Langzeitisolationen festzustellen. Bei Kurzzeitisolierung der Protoplasten lagen die Werte zwischen 1369 und 1625 pMol * (min Testzeit)$^{-1}$ * (mg Protein)$^{-1}$. Diese Werte sind insgesamt etwas höher als die bei LANGEBARTELS et al. (1981) angegebenen; dies ist vor allem auf die Optimierung der Testbedingungen durch INGOLD (1985) zurückzuführen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Kohlenhydrate und Glycoproteine der Zellwand und des Mediums von Suspensionzellen und regenerierenden Protoplasten wurden untersucht.
Protoplasten wurden zur Trennung von Membranen in linearen Gradienten herangezogen.
Eine neue Technik zur Reinigung von Membranen mit Hilfe von "microbeads" wurde auf die Protoplasten der Karotte übertragen.

1. Die Menge der Kohlenhydrate in der Zellwand von Suspensionszellen ändert sich im Verlauf der Kultur. Die Änderung steht im Zusammenhang mit dem Wachstumsverhalten der Zellkultur. In der Phase hoher Teilungsaktivität ist die Menge an Gesamtkohlenhydrat am geringsten. Dies entspricht der hohen Zahl an Zellen je Gramm Frischgewicht, d.h. die Zellen sind in dieser Phase kleiner. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nimmt die Menge an Kohlenhydraten zu; dabei steigt der prozentuale Anteil der Cellulose stark an.
Die Menge der extrazellulären Polysaccharide hat ein Maximum am 5. Tag.
Die Polysaccharide des Mediums unterscheiden sich in ihrer Gesamtheit deutlich von der Zellwand. Bei der Fraktionierung treten fast nur Pektine auf. In der Zellwand dominiert bei 5 d alten Zellen die Hemicellulose-Fraktion.
Die Zellwand ist durch einen hohen Anteil von Arabinose an den neutralen Zuckern gekennzeichnet. Stark vertreten sind ebenfalls Glucose und Galactose. Betrachtet man die Fraktionen der Zellwand, nimmt Arabinose vor allem in den Hemicellulosen die dominierende Stellung ein, Glucose dagegen in den Pektinen und in der Cellulose-Fraktion. Die letztgenannte Fraktion enthält einen relativ hohen Anteil von Mannose. Die Aufklärung der makromolekularen Komponenten, in denen die Zucker vertreten sind, sollte angestrebt werden, um einen Vergleich mit *in vitro* gebildeten Produkten aus

Enzymtests durchführen zu können.
Bei den extrazellulären Polysacchariden dominiert Galactose. Es wurden aber keine Analysen der Fraktionen durchgeführt. Die Menge der ECP ist am 5. Tag etwa 1/7 der Zellwand, bezogen auf die Zellzahl.
Die absoluten Mengen der Kohlenhydrate in der Zellwand liegen bei 5 d alten Zellen bei 650 µg. Die Summe der Kohlenhydrate der Fraktionen stimmt mit dem direkt gemessenen Wert der Zellwand sehr gut überein.
Der Anteil an Uronsäuren am Gesamtkohlenhydrat ist bei 5 d alten Kulturen im Medium etwa doppelt so hoch wie in der Zellwand; dies steht in Einklang mit der Fraktionierung, die bei den ECP fast nur Pektine ergibt.

2. Protoplasten der Zellinie DC_{B1} regenerieren in 4 Tagen eine Zellwand, die mengenmäßig der von sich rasch teilenden Suspensionszellen entspricht. Die Zuckerzusammensetzung ist allerdings wesentlich verschieden. In der regenerierten Zellwand ist der überragende Anteil Glucose, auch Mannose ist im Vergleich mit Suspensionszellen stark vertreten. Die prozentuale Verteilung ändert sich während der Kultivierung nicht.
Cellulose nimmt mengenmäßig etwa 10 % der Zellwand ein. Der niedrige Cellulose-Gehalt scheint ein Kennzeichen von regenerierenden Protoplasten zu sein. Der Anteil an Uronsäuren in der Zellwand ist bei regenerierenden Protoplasten wesentlich höher als bei Suspensionszellen. Bei der Fraktionierung nehmen Pektine und Hemicellulosen etwa gleiche Anteile ein.
Die Ergebnisse sind Anlaß für die Suche nach einem Glucomannan in der Zellwand regenerierender Protoplasten. Vorläufige Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Glucose überwiegend in ß-1,4-Bindungen vorkommt (EMMERLING, persönliche Mitteilung). Es könnte eine Übereinstimmung mit Produkten aus *in vitro*-Testansätzen bei Suspensionszellen bestehen. Deshalb soll die Aktivität von Glycosyltransferasen mit den veränderten Testansätzen nach INGOLD (1985) im Verlauf

der Kultivierung verfolgt werden.
Die im Vergleich mit Suspensionszellen einfachere Zellwand der regenerierenden Protoplasten bringt sicher eine Reduzierung der Vielzahl an der Zellwandsynthese beteiligten Enzyme mit sich. Dies ist für die Analyse von *in vitro* gebildeten Produkten hilfreich und erleichtert die gezielte Suche nach bestimmten Aktivitäten.
Einschränkend muß gesagt werden, daß die Zusammensetzung der ECP im Vergleich zur Zellwand vielfältiger ist.
Vor allem zu Beginn der Kultur sind die ECP in Relation zur Zellwand stark vertreten, das Verhältnis ändert sich jedoch im Verlauf der Kultur; dies bedeutet, daß rascher und mehr Zellwandmaterial integriert wird, als Polysaccharide abgeschieden werden.

3. Mit einem Yariv-Reagenz konnte hydroxyprolinhaltiges Material aus dem Kulturfiltrat 7 d alter Suspensionkulturen ausgefällt werden. Etwa 70 % des Hydroxyprolins finden sich im Sediment. Es handelt sich vermutlich um ein Arabinogalactan-Protein. Ein weiterer Nachweis könnte durch isoelektrische Fokussierung erbracht werden.
Aus dem Medium regenerierender Protoplasten konnte mit dem Reagenz nur etwa 20 % des Hydroxyprolins präzipitiert werden. Es müßte untersucht werden, ob der verbliebene Anteil aus "precursor"-Molekülen des Extensins besteht. Es könnten auch Arabinogalactan-Proteine vorhanden sein, die mit dem vewendeten Reagenz nicht ausgefällt werden können.
Der Extensin-Gehalt der Zellinie DC_{B1} ist niedriger als bei anderen Zellkulturen. Er wurde jedoch nur für den 5. Tag bestimmt und nicht über die gesamte Kultivierung verfolgt.
Der Hydroxyprolin-Gehalt, und damit mutmaßliches Extensin, ist bei regenerierenden Protoplasten höher als bei Suspensionszellen; es bleibt zu klären, wie die gleichzeitig geringere Menge an Cellulose mit dem "warp and weft"-Modell in Einklang zu bringen ist. Vielleicht handelt es sich auch im Falle der Zellwand hauptsächlich um "precursor"-Moleküle des

Extensins, die keine intermolekularen Diphenyletherbrücken ausbilden konnten und so nicht fest in die Zellwand integriert sind. Damit ließe sich auch der hohe Anteil des Hydroxyprolins im Medium erklären, der nicht mit dem Yariv-Reagenz präzipitiert werden kann.

4 Bei der Trennung von Membranen aus Protoplasten war die sehr niedrige Dichte der Plasmamembran ein auffälliges Merkmal. Die Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration und der Zentrifugationsdauer führte zu keiner Änderung. Das "Trennsystem" konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da Membranen aus Suspensionszellen mit der üblichen Dichte des Plasmalemmas aufgetrennt wurden.
Einen Einfluß zeigte die Art der Isolierung von Protoplasten. Nach Kurzzeitisolierung trat eine Schulter der GT II U bei höherer Dichte auf. Nach Zugabe von BSA zeigten die Leitenzyme des Plasmalemmas 2 Gipfel. Vermutlich liegt ein Abbau von Proteinen der Plasmamembran vor. Die zellwandabbauenden Enzyme enthalten Proteasen; durch Zugabe von BSA werden die Proteine des Plasmalemmas geschützt. In jedem Fall sind die Protoplasten jedoch vital und regenerieren eine Zellwand. Die Isolierung der Protoplasten könnte aber auch bei Experimenten zur Regeneration mit BSA oder Proteinase-Hemmstoffen durchgeführt werden.

5. Die "microbeads"-Methode zur Isolierung von Membranen konnte auf die Protoplasten der Karotte übertragen werden. Aufgrund der hohen Dichte der "microbeads" sedimentieren die bei der Lyse entstehenden "sheets" auch bei niedertouriger Zentrifugation sehr rasch, auch durch Saccharose-Stufen hoher Konzentration.
Große Probleme bei der Reinigung des Plasmalemmas bereiteten unlysierte Protoplsten oder Fragmente, die auch ohne Behandlung der Protoplasten mit "microbeads" auftreten. Sie sedimentieren ebenfalls sehr rasch und können schlecht ausgewaschen werden. Werden die Protoplasten mit "microbeads" be-

haftet, haben auch die Fragmente eine höhere Dichte.
Ein verbesserter Aufschluß mit Ultraschall oder durch eine Parr-Bombe erbrachte Fortschritte, aber keine grundsätzliche Lösung des Problems. Es wurden 2 Techniken gefunden, mit denen eine Trennung zwischen "sheets" und unerwünschtem Material erzielt werden kann: Einmal durch geeignete Wahl der Beschleunigung bei kurzer Zentrifugation des Lysates über Saccharose-Stufen hoher Konzentration. Zweitens kann die rasche Sedimentation der "sheets" bei niedertouriger Zentrifugation reduziert werden, wenn das Lysat auf eine hohe Saccharose-Dichte eingestellt wird. Große Protoplasten-Bruchstücke sedimentieren aber auch dann noch. Aus dem Überstand kann dann die Plasmamembran gereinigt werden. Die Anreicherung der GT II U betrug in diesem Fall 10, liegt also höher als bei linearen Gradienten. Die Ausbeute beträgt 20 %.
Ein Nachteil der neu entwickelten Methode ist sicher die Beschränkung auf Protoplasten. Möglicherweise lassen sich Ausbeute und Reinheit der Plasmamembran-Präparationen weiter verbessern, sodaß die Methodik in diesem speziellen System an Bedeutung gewinnt.
Es konnte auch gezeigt werden, daß sich die anderen Membranen nach Abtrennung des Plasmalemmas im linearen Gradienten auftrennen lassen und somit eine geringere Kontamination aufweisen. Dieser Aspekt ist sicher für die Lokalisierung membrangegundener Enzyme bedeutsam. Möglicherweise können die Subkompartimente des Golgi-Apparates und Sekretvesikel in Gradienten leichter identifiziert werden.

VI. LITERATUR

AKIYAMA, Y., KATO, K. (1981): An extracellular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*. Phytochem. 20, 2507-2510

ALBERTSSON, P.-A. (1971): Partition of Cell Particles and Macromolecules. 2. Ed. Wiley & Sons, New York

ALFERMANN, W., REINHARD, E. (1971): Isolierung anthocyanhaltiger und anthocyanfreier Gewebestämme von *Daucus carota*: Einfluß von Auxinen auf die Anthocyanbildung. Experimentia 27, 353-354

ALI, S.M., AKAZAWA, T. (1986): Association of H^+-translocating ATPase in the Golgi membrane system from suspension-cultured cells of sycomore (*Acer pseudoplatanus* L.). Plant Physiol. 81, 222-227

ALONI, Y., DELMER, D.P., BENZIMAN, M. (1982): Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4-ß-D-glucan: Activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, PEG and a protein factor. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 6448-6452

ALONI, Y., COHEN, R., BENZIMAN, M., DELMER, D.P. (1983): Solubilization of the UDP-Glucose: 1,4-ß-D-glucosyltransferase (cellulose synthase) from *Acetobacter xylinum*. A comparison of regulatory properties with those of the membrane bound form of the enzyme. J. Biol. Chem. 258, 4419-4423

AMINO, S., KOMAMINE, A. (1985): Turnover of Cell Wall Polysaccharides during the Cell Cycle in a Synchronous Culture of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Phsiol. 26, 745-751

ANDERSON, R.L., CLARKE, A.E., JERMYN, M.A., KNOX, R.B., STONE, B.A. (1977): A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*. Aust. J. Plant Physiol. 4, 143-158

ANDREAE, M., LANG, W.C., ROBINSON, D.G. (1986): Localization of hydroxyproline-rich glycoprotein biosynthesis in carrot cells. In: Cell Walls '86. Proceedings of the Fourth Cell Wall Meeting. Paris, September 1986. Vian, B., REIS, D., Goldberg, R. (Eds.), p. 60-63

ASAMIZU, T., TANAKA, K., TAKEBE, I., NISHI, A. (1977): Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. Physiol. Plant. 40, 215-218

ASAMIZU, T., NISHI, A. (1979): Biosynthesis of cell-wall polysaccharides in cultured carrot cells. Planta 146, 49-54

ASAMIZU, T., NISHI, A. (1980): Regenerated cell wall of carrot protoplasts isolated from suspension-cultured cells. Physiol. Plant. 48, 207-212

ASAMIZU, T., NAKANO, N., NISHI, A. (1983): Changes in non-cellulosic cell wall polysaccharides during the growth of carrot cells in suspension cultures. Planta 158, 166-174

BACIC, A., DELMER, D.P. (1981): Stimulation of membrane-associated polysaccharide synthetases by a membrane potential in developing cotton fibres. Planta 152, 346-351

BAUER, W.D., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., ALBERSHEIM, P. (1973): The structure of plant cell walls II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycomore cells. Plant Physiol. 51, 174-187

BAYDOUN, E.A.-H., BRETT, C.T. (1984): The effect of pH on the binding of calcium to pea epicotyl cell walls and its implications for the control of cell extension. J. Exp. Botany 35, 1820-1831

BLAKELY, L.M., STEWARD, F.C. (1964): Growth and organized development of cultured cells. V. The growth of colonies from free cells on nutrient agar. Amer. J. Bot. 51, 780-791

BLANKENSTEIN, P., LANG, W.C., ROBINSON, D.G. (1986): Isolation and characterization of prolyl hydroxylase from *Chlamydomonas reinhardii*. Planta 169, 238-244

BLASCHEK, W., HAASS, D., KOEHLER, H., FRANZ, G. (1981): Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts: chemical and biochemical aspects. Plant Sci. Lett. 22, 47-57

BLASCHEK, W., KOEHLER, H., SEMLER, U., FRANZ, G. (1982): Molecular weight distribution of cellulose in primary cell walls. Investigations with regeneration protoplasts, suspension cultured cells and mesophyll of tobacco. Planta 154, 550-555

BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54, 484-489

BOLWELL, G.P., NORTHCOTE, D.H. (1983): Arabinan synthase and xylan synthase activities of *Phaseolus vulgaris*. Subcellular localization and possible mechanism of action. Biochem. J. 210, 497-507

BOLWELL, G.P., NORTHCOTE, D.H. (1984): Demonstration of a common antigenic site on endomembrane proteins of *Phaseolus vulgaris* by a rat monoclonal antibody. Tentative identification of arabinan synthase and consequences for its regulation. Planta 162, 139-146

BOLWELL, G.P., DALESSANDRO, G., NORTHCOTE, D.H. (1985a): Decrease of polygalacturonic acid synthase during xylem differentiation in sycomore. Phytochem. 24, 699-702

BOLWELL. G.P., ROBBINS, M.P., DIXON, R.A. (1985b): Elicitor-induced prolyl hydroxylase from French bean (*Phaseolus vulgaris*). Localization, purification and properties. Biochem. J. 229, 693-699

BOLWELL, G.P., ROBBINS, M.P., DIXON, R.A. (1985c): Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components. Eur. J. Biochem. 148, 571-578

BOSS, W.F., RUESINK, A.W. (1979): Isolation and characterization of Concanavalin A-labeled plasma membranes of carrot protoplasts. Plant Physiol. 64, 1005-1011

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

BRETT, C.T. (1981): Polysaccharide synthesis from GDP-glucose in pea epicotyl slices. J. Exp. Botany 32, 1067-1077

BROWN Jr., R.M. (1985): Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. In: The cell surface in plant growth and development. J. Cell Sci., Suppl. 2, 13-32

BROWN Jr., R.M., HAIGLER, C.H., SUTTIE, J., WHITE, A.R., ROBERTS, E., SMITH, C., ITOH, T., COOPER, K., (1983): The biosynthesis and degradation of cellulose. Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium 37, 33-78

BRUMMELL, D.A. (1986): Cell wall acidification and its role in auxin-stimulated growth. J. Exp. Botany 37, 270-276

BRYSK, M.M., CHRISPEELS, M.J. (1971): Isolation and partial characterization of a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein and its cytoplasmic precursor. Biochim. Biophys. Acta 257, 421-432

BUCHELI, P., DÜRR, M., BUCHALA, A.J., MEIER, H. (1985): ß-glucanases in developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibres. Planta 166, 530-536

BURGESS, J. (1983): Wall regeneration around isolated protoplasts. Int. Rev. Cytol., Suppl. 16, 55-77

CASSAB, G.I., NIETO-SOTELO, J., COOPER, J.B., VAN HOLST, G.-J., VARNER, J.E. (1985): A Developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. Plant Physiol. 77, 532-535

CHADWICK, C.M., NORTHCOTE, D.H. (1980): Glucosylation of phosphorylisoprenol and sterol at the plasma membrane of soya-bean (*Glycine max*) protoplasts. Biochem. J. 186, 411-421

CHAMBAT, G., JOSELEAU, J.-P., BARNOUD, F. (1981): The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures of *Rosa glauca*. Phytochem. 20, 241-246

CHANEY, L.K., JACOBSON, B.S. (1983): Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins. J. Biol. Chem. 258, 10062-10072

CHANSON, A., MCNAUGHTON, E., TAIZ, L. (1984): Evidence for a KCl-stimulated, Mg^{2+}-ATPase on the Golgi of corn coleoptiles. Plant Physiol. 76, 498-507

CHANSON, A., TAIZ, L. (1985): Evidence for an ATP-dependent proton pump on the Golgi of corn coleoptiles. Plant Physiol. 78, 232-240

CHEN, J., VARNER, J.E. (1985): Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33-kDa protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 4399-4403

CHRISPEELS, M.J. (1969): Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolecules in carrots. I. Kinetic analysis. Plant Physiol. 44, 1187-1193

CHURCHILL, K.A., SZE, H. (1983): Anion-sensitive, H^+-pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. Plant Physiol. 71, 610-617

CLELAND, R.E. (1973): Auxin-induced hydrogen ion excretion from *Avena* coleoptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3092-3093

CLELAND, R.E. (1986): The Role of Hormones in Wall Loosening and Plant Growth. Aust. J. Plant Physiol. 13, 93-103

COCKING, E.C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187, 962-963

COHEN, P.B., SCHIBECI, A., FINCHER, G.B. (1983): Biosynthesis of arabinogalactan-protein in *Lolium multiflorum* (ryegrass) endosperm cells. III. Subcellular distribution of prolyl hydroxylase. Plant Physiol. 72, 754-758

COOPER, J.B. (1984): Hydroxyproline synthesis is required for cell wall regeneration. In: Structure, Function and Biosynthesis of Plant Cell Walls. Dugger, W.M., Bartnicki-Garcia, S. (Eds.). American Society of Plant Physiologists, Washington, p. 397-399

COOPER, J.B., VARNER, J.E. (1983a): Selective inhibition of proline hydroxylation by 3,4-dehydroproline. Plant Physiol. 73, 324-328

COOPER, J.B., VARNER, J.E. (1983b): Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. Biochem. Biophys. Res. Comm. 112, 161-167

COOPER, J.B., VARNER, J.E. (1984): Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. Plant Physiol. 76, 414-417

CROSS, W., BRIGGS, W.R. (1976): An evaluation of markers for plasma membrane fractions from Zea *mays*. Carnegie Inst. Washington Year Book 75/76. P.379-383

DALESSANDRO, G., NORTHCOTE, D.H. (1981): Increase of xylan synthetase activity during xylem differentiation of the vascular cambium of sycomore and poplar trees. Planta 151, 61-67

DARVILL, A.G., MCNEIL, M., ALBERSHEIM, P. (1978): The structure of plant cell walls VIII. A new pectic polysaccharide. Plant Physiol. 62, 418-422

DARVILL, A., MCNEIL, M., ALBERSHEIM, P., DELMER, D.P. (1980): The primary cell walls of flowering plants. In: The Biochemisty of Plants, Vol. 1. Stumpf, P.K., Conn, E.E. (Eds.), p. 91-162

DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. (1984): PHYTOALEXINS AND THEIR ELICITORS-A Defense Against Microbial Infection in Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 243-275

DELMER, D.P. (1977): The biosynthesis of cellulose and other plant cell wall polysaccharides. In: Recent Advances in Phytochemistry. Plenum Publishing Corp., New York. P. 45-77

DELMER, D.P., COOPER, G., ALEXANDER, D., COOPER, J., HAYASHI, T., NITSCHE, C., THELEN, M. (1985): New approaches to the study of cellulose biosynthesis. In: The cell surface in plant growth and development. J. Cell Sci., Suppl. 2, 33-50

DE LUCA, L., BADER, U., HERTEL, R., PUPILLO, P. (1984): Detergent activity of NADH Oxidase in vesicles derived from the plasma membrane of *Cucurbita pepo* L. Plant Sci. Lett. 36, 93-98

DEY, P.M., BRINSON, K. (1984): Plant cell walls. In: Adv. in Carboh. Chemistry and Biochemistry, 42, 265-382

DOUGALL, D.K., SHIMBAYASHI, K. (1960): Factors affecting growth of tobacco callus tissue and its incorporation of tyrosine. Plant Physiol. 35, 396-404

DRODZD, M., KUCHARZ, E., SZYJA, J., (1976): A colorimetric micromethod for determination of hydroxyproline in blood serum. Z. med. Labortechnik 17, 163-171

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356

EDWARDS, M., DEA, I.C.M., BULPIN, P.V., REID, J.S.G. (1986): Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1,4)-ß-D-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). J. Biol. Chem., in press

EMMERLING, M. (1986): Zellwandregeneration bei Protoplasten. Gaschromatographische Analyse von Polysacchariden. Diplomarbeit, Tübingen

EMONS, A.M.C. (1982): Microtubules do not control microfibril orientation in a helicoidal cell wall. Protoplasma 113, 85-87

EPSTEIN, L., LAMPORT, D.T.A. (1984): An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. Phytochem. 23, 1241-1246

ESQUERRE-TUGAYE, M.T., MAZAU, D., PELISSIER, B., ROBY, D., RUMEAU, D., TOPPAN, A. (1985): Induction by elicitors and ethylene of proteins associated to the defense of plants. In: Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. Alan R. Liss Inc, New York. P. 459-473

FALCONER, M.M., SEAGULL, R.W. (1985): Xylogenesis in tissue culture: Taxol effects on microtubule reorientation and lateral association in differentiating cells. Protoplasma 128, 157-166

FERRARI, T.E., PALMER, J.E., WIDHOLM, J. (1975): Monitoring protoplast production from plant cells. Plant Sci. Lett. 4, 145-147

FINCHER, G.B., STONE, B.A., CLARKE, A.E. (1983): Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. Ann. Rev. Plant Physiol. 34, 47-70

FORSEE, W.T., LAINE, R.A., ELBEIN, A.D. (1974): Solubilization of a particulate UDP-glucose:sterol ß-Glucosyltransferase in developing cotton fibers and seeds and characterization of steryl 6-acyl-D-glucosides. Arch. Biochem. Biophys. 161, 248-259

FOWKE, L.C., GAMBORG, O.L. (1980): Applications of protoplasts to the study of plant cells. Int. Rev. Cytol. 68, 9-51

FRY, S.C. (1982): Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell wall glycoprotein. Biochem. J. 204, 449-455

FRY, S.C. (1983a): Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. Planta 157, 111-123

FRY, S.C. (1983b): Oxidative phenolic coupling reactions cross-link hydroxyproline-rich glycoprotein molecules in plant cell wall. In: Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology 2. Randall, D.D., Blevins, D.G., Larson, R.L., Rapp, B.J. (Eds.). Univ. Miss. Press, p. 59-72

FRY, S.C. (1985): Primary cell wall metabolism. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 2, Miflin, B.J. (Ed.). Oxford, Clarendon. P. 1-42

FRY, S.C. (1986): Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Ann. Rev. Plant Physiol. 37, 165-186

GALBRAITH, D.W., NORTHCOTE, D.H. (1977): The isolation of plasma membrane from protoplasts of soybean suspension cultures. J. Cell Sci. 24, 295-310

GIDDINGS Jr., T.H., BROWER, D.L., STAEHELIN, L.A. (1980): Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. J. Cell Biol 84, 327-339

GIRARD, V., FEVRE, M. (1984): ß-1-4- and ß-1-3-glucan synthases are associated with the plasma membrane of the fungus *Saprolegnia*. Planta 160, 400-406

GOLDBACH, H., AMBERGER, A. (1986): Influence of boron nutrition on cell wall polysaccharides in cell cultures of *Daucus carota* L. J. Plant Physiol. 123, 263-269

GORDON-KAMM, W.J., STEPONKUS, P.L. (1984a): The behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: Implications in freezing injury. Protoplasma 123, 83-94

GORDON-KAMM, W.J., STEPONKUS, P.L. (1984b): The influence of cold acclimation on the behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts. Protoplasma 123, 161-173

GRIFFING, L.R., MERSEY, B.G., FOWKE, L.C. (1986): Cell-fractionation analysis of glucan synthase I and II distribution and polysaccharide secretion in soybean protoplasts. Planta 167, 175-182

GROSS, K.C., SAMS, C.E. (1984): Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. Phytochem. 23, 2457-2461

HAHNE, G., HOFFMANN, F. (1984): Dimethyl sulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 5449-5453

HAGER, A., MENZEL, H., KRAUSS, A. (1971): Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. Planta 100, 47-75

HAGER, A., BIBER, W. (1984): Functional and regulatory properties of H^+ pumps at the tonoplast and plasma membranes of Zea *mays* coleoptiles. Z. Naturforsch. 39c, 927-937

HANKE, D.E., NORTHCOTE, D.H. (1974): Cell wall formation by soybean callus protoplasts. J. Cell Sci. 14, 29-50

HARRIS, P.C., HENRY, R.J., BLAKENEY, A.B., STONE, B.A. (1984): An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. Carboh. Res. 127, 59-73

HAYASHI, T., WONG, Y.-S., MACLACHLAN, G. (1984): Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1,4-ß-glucanases. Plant Physiol. 75, 605-610

HEATH, I.B., SEAGULL, R.W. (1982): Orientated cellulose fibrils and the cytoskeleton: A critical comparison of models. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. C.W. Lloyd (Ed.). Academic Press, London New York. P. 163-182

HELLER, J.S., VILLEMEZ, C.L. (1972a): Solubilization of a mannose-polymerizing enzyme from *Phaseolus aureus*. Biochem. J. 128, 243-252

HELLER, J.S., VILLEMEZ, C.L. (1972b): Interaction of soluble glucosyl- and mannosyl-transferase enzyme activities in the synthesis of a glucomannan. Biochem. J. 129, 645-655

HERTEL, R., JESAITIS, A.J., DOHRMANN, U., BRIGGS, W.R. (1980): In vitro binding of riboflavin to subcellular particles from maize coleoptiles and *Cucurbita* hypocotyls. Planta 147, 312-319

HINTON, R.H., MULLOCK, B.M. (1976): Physicochemical properties of iodinated density-gradient media. In: The use of iodinated density gradient media for biological separations. Rickwood, D. (Ed.), Information Retrieval Ltd., London, p. 1-14

HODGES, T.K., LEONARD, R.T. (1974): Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. In: Methods of Enzymology. C.S.P. Colowick, N.O. KAPLAN (eds.), Vol. 32B, Academic Press, New York. S. 392-406

HODGES, T.K., MILLS, D. (1986): Isolation of the plasma membrane. Methods in Enzymology 118, 41-54

HOPP, H.E., ROMERO, P.A., DALEO, G.R., PONT LEZICA, R. (1978): Synthesis of cellulose precursors. The involvement of lipid-linked sugars. Eur. J. Biochem. 84, 561-571

HOPP, W., HINDERER, W., PETERSEN, M., SEITZ, H.U. (1985): Anthocyanin-containing vacuoles isolated from protoplasts of *Daucus carota* cell cultures. In: The Physiological Properties of Plant Protoplasts. P.E. Pilet (Ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 122-132

INGOLD, E. (1982): Isolierung und Charakterisierung von Glucansynthetase-Aktivitäten in Membranvesikeln aus pflanzlichen Zellkulturen (*Daucus carota* L.). Diplomarbeit, Tübingen

INGOLD, E. (1985): ß-Glucansynthese in zellfreien Systemen: Charakterisierung, Isolierung und Reinigung beteiligter Enzyme aus Suspensionskulturen von *Daucus carota* L. Dissertation, Tübingen

INGOLD, E., SEITZ, H.U. (1986): Characterization and properties of differnt glucosyltransferases isolated from suspension-cultured cells of *Daucus carota*. Z. Naturforsch. 41c, 409-420

INOUHE, M., YAMAMOTO, R., MASUDA, Y. (1984): Auxin-induced changes in the molecular weight distribution of cell wall xyloglucans in *Avena* coleoptiles. Plant Cell Physiol. 25, 1341-1351

JACOBS, M., HERTEL, R. (1978): Auxin binding to subcellular fractions from *Cucurbita* hypocotyls: In vitro evidence for an auxin transport carrier. Planta 142, 1-10

JERMYN, M.A., YEOW, Y.M. (1975): A class of lectins present in the tissues of seed plants. Aust. J. Plant Physiol. 2, 501-531

KATO, K., WATANABE, F., EDA, S. (1977): An Arabinogalactan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured tobacco cells. Agric. Biol. Chem. 41, 533-538

KATO, Y., MATSUDA, K. (1985): Acidic arabinoxylan as an extracellular polysaccharide of suspension-cultured soybean cells. Plant Cell Physiol. 26, 287-294

KAUSS, H. (1985): Callose biosynthesis as a Ca^{2+}-regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. In: The cell surface in plant growth and development. J. Cell Sci., Suppl. 2, 89-103

KAWASAKI, S., SATO, S. (1979): Isolation of the Golgi apparatus from suspension cultured tobacco cells and preliminary observations on the intracellular transport of extensin-precursor. Bot. Mag. Tokyo 92, 305-314

KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W.D., ALBERSHEIM, P. (1973): The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycomore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol. 51, 188-196

KJELLBOM, P., LARSSON, C. (1984): Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. Physiol. Plant. 62, 501-509

KLEIN, A.S., MONTEZINOS, D., DELMER, D.P. (1981): Cellulose and 1,3-glucan synthesis during the early stages of wall regeneration in soybean protoplasts. Planta 152, 105-114

KOBLITZ, H., HAGEN, F. (1962): Vergleichende Untersuchungen über das Wachstum isolierter Karottengewebe auf halbsynthetischen Substraten und auf einem vollsynthetischen Medium. Flora 152, 447-457

KÖHLE, H., JEBLICK, W., POTEN, F., BLASCHEK, W., KAUSS, H. (1985): Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+}-dependent process. Plant Physiol. 77, 544-551

KONNO, H., YAMAYA, T., YAMASAKI, Y., MATSUMOTO, H. (1984): Pectic polysaccharide breakdown of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. Plant Physiol. 76, 633-637

LABAVITCH, J.M., RAY, P.M. (1974): Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by IAA. Plant Physiol. 54, 499-502

LAMPORT, D.T.A. (1965): The protein component of primary cell walls. Adv. Bot. Res. 2, 151-218

LAMPORT, D.T.A. (1986): The primary cell wall: A new model. In: Cellulose. Structure, Modification and Hydrolysis. Young, R.A., Rowell, R.M. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, p. 77-90

LAMPORT, D.T.A., EPSTEIN, L. (1983): A new model for the primary cell wall: A concatenated extensin-cellulose network. Current Topics Plant Biochem. Physiol. 2, 73-83

LAMPORT, D.T.A., NORTHCOTE, D.H. (1960): Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. Nature 188, 665-666

LANG, J.M., EISINGER, W.R., GREEN, P.B. (1982): Effects of ethylene on the orientation of microtubules and cellulose microfibrills of pea epicotyl cells with polylamellate cell walls. Protoplasma 110, 5-14

LANGEBARTELS C. (1981): Die Phase der Zellwandregeneration kultivierter Protoplasten von *Daucus carota*L. Dissertation, Tübingen

LANGEBARTELS, C., SEITZ, U., SEITZ, H.U. (1981): ß-glucan synthetase activities in regenerating protoplasts from carrot suspension cultures. Plant Sci. Lett., 22, 327-335

LARSSON, C. (1985): Plasma membranes. In: Modern Methods of Plant Analysis. New Series, Vol. 1. Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.), p. 85-104

LAU, J.M., MCNEIL, M., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. (1985): Structure of the backbone of rhamnogalacturon I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. Carboh. Res. 137, 111-125

LIN, T.-J., MORALES, M.F. (1977): Application of a one step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: The actomyosin ATPase system. Anal. Biochem. 77, 10-17

LLOYD, C.W. (1984): Toward a dynamic helical model for the influence of microtubules on wall patterns in plants. Int. Rev. Cytol. 86, 1-51

LLOYD, C.W., SLABAS, A.R., POWELL, A.J., LOWE, S.B. (1980): Microtubules, protoplasts and plant cell shape. An immunofluorescent study. Planta 147, 500-506

LLOYD, C.W., CLAYTON, L., DAWSON, P.J., DOONAN, J.H., HULME, J.S., ROBERTS, I.N., WELLS, B. (1985): The cytoskeleton underlying side walls and cross walls in plants: molecules and macromolecular assemblies. In: The Cell surface in plant growth and development. J. Cell Sci., Suppl. 2, 143-155

MARCHANT, H.J., HINES, E.H. (1979): The role of microtubules and cell-wall deposition in elongation of regenerating protoplasts of *Mougeotia*. Planta 146, 41-48

MASUDA, H., OZEKI, Y., AMINO, S., KOMAMINE, A. (1984): Changes in cell wall polysaccharides during elongation in a 2,4-D free medium in a carrot suspension culture. Physiol. Plant. 62, 65-72

MELTON, L.D., MCNEIL, M., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P., DELL, A. (1986): Structural characterization of oligosaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. Carboh. Res. 146, 279-305

MEYER, Y., HERTH, W. (1982): Interaction of cell-wall formation and cell division in higher plant cells. In: Cellulose and other Natural Polymer Systems. R.M. Brown Jr. (Ed.), Plenum Press, New York, p. 149-165

MCNEIL, M., DARVILL, A.G., FRY, S.C., ALBERSHEIM, P. (1984): Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53, 625-663

MONTEZINOS, D. (1982): The role of the plasma membrane in cellulose microfibril assembly. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. C.W. Lloyd (Ed.). Academic Press, London, New York. P. 147-162

MUELLER, S.C., BROWN Jr., R.M. (1980): Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril sythesizing complex in higher plants. J. Cell Biol. 84, 315-326

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 473-496

NAGAHASHI, G. (1985): The marker concept in cell fractionation. In: Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 1. Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin. P. 67-84

NISHITANI, K., MASUDA, Y. (1982): Roles of auxin and gibberellic acid in growth and maturation of epicotyls of *Vigna angularis* cell wall changes. Physiol. Plant. 56, 38-46

NISHITANI, K., MASUDA, Y. (1983): Acid pH-induced structural changes in cell wall xyloglucans in *Vigna angularis* epicotyl segments. Plant Sci. Lett. 28, 87-94

NOE, W. (1979): Anthocyan-Stoffwechsel bei Suspensionskulturen von *Daucus carota* (L.). Die Wirkung von L-α-Aminooxy-ß-phenylpropionsäure (L-AOPP) und Gibberellinsäure (GA_3). Diplomarbeit, Tübingen

NORTHCOTE, D.H. (1979): The involvement of the golgi-apparatus in the biosynthesis and secretion of glycoproteins and polysaccharides. In: Biomembranes, Vol.10, Manson, L.A., (Ed.). Plenum Press, New York, London. P. 51-76

ODZUCK, W., KAUSS, H. (1972): Biosynthesis of pure araban and xylan. Phytochem. 11, 2489-2494

O'NEILL, M.A., SELVENDRAN, R.R. (1980): Glycoproteins from the cell wall of *Phaseolus coccineus*. Bioch. J. 187, 53-63

O'NEILL, S.D., BENNETT, A.B., SPANSWICK, R.M. (1983): Characterization of a NO_3^--sensitive H^+-ATPase from corn roots. Plant Physiol. 72, 837-846

PAULL, R.E., CHEN, N.J. (1983): Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. Plant Physiol. 72, 382-385

PERCIVAL, E., MCDOWELL, R.H. (1981): Algal Walls-Compsition and Biosynthesis. In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 13B. Pirson, A, Zimmermann, M.H. (Eds.) P. 277-316

PERLIN, D.S., SPANSWICK, R.M. (1980): Labeling and isolation of plasma membranes from corn leaf protoplasts. Plant Physiol. 65, 1053-1057

PILET, P.-E., BLASCHEK, W., SENN, A., FRANZ, G. (1984): Comparison between maize root cells and their respective regenerating protoplasts: Wall polysaccharides. Planta 161, 465-469

POLONENKO, D.R., MACLACHLAN, G.A. (1984): Plasma-membrane sheets from pea protoplasts. J. Exp. Botany 35, 1342-1349

POOLE, R.J., BRISKIN, D.P., KRATKY, Z., JOHNSTONE, R.M. (1984): Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. Plant Physiol. 74, 549-556

POPE, D.G. (1977): Relationships between hydroxyproline-containing proteins secreted into the cell wall and medium by suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Physiol. 59, 894-900

PRESTON, R.D. (1979) Polysaccharide conformation and cell wall function. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 55-78

QUADER, H., HERTH, W. (1986): Cell wall of *Prototheca zopfii*: New aspects. In: Cell Walls '86. Proceedings of the Fourth Cell Wall Meeting, Paris. Vian, B., Reis, D., Goldberg, R. (Eds.). Suppl., p. 14-15

QUAIL, P.H. (1979): Plant cell fractionation. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 425-484

RASI-CALDOGNO, F., DE MICHELIS, M.I., PUGLIARELLO, M.C. (1982): Ca^{2+} transport in purified membrane vesicles from pea internodes. Relationship between ATP-dependent Ca^{2+} uptake and ATP-dependent electrogenic transport. In: Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell. Marme, D., Marre, E., Hertel, R. (Eds.), Elsevier. P. 361-367

RAY, P.M. (1980a): Cooperative action of ß-glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. Biochim. Biophys. Acta 629, 431-444

RAY, P.M. (1980b): Auxin and Fusicoccin enhancement of ß-glucan synthase in peas. Plant Physiol. 78, 466-472

RAY, P.M., EISINGER, W.R., ROBINSON, D.G. (1976): Organelles involved in cell wall polysaccharide formation and transport in pea cells. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 121-146

REA, P.A., POOLE, R.J. (1986): Chromatographic resolution of H^+-tranlocating pyrophosphatase from H^+-translocating ATPase of higher plant tonoplast. Plant Physiol. 81, 126-129

REID, J.S.G. (1985): Cell wall storage carbohydrates in seeds - Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". Adv. Bot. Res. 11, 125-155

REISS, H.-D., SCHNEPF, E., HERTH, W. (1984): The plasma membrane of the *Funaria* caulonema tip cell: morphology and distribution of particle rosettes, and the kinetics of cellulose synthesis. Planta 160, 428-435

ROBINSON, D.G. (1985): Plant Membranes. Endo- and Plasma Membranes of Plant Cells. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York

ROBINSON, D.G., EISINGER, W.R., RAY, P.M. (1976): Dynamics of the golgi system in wall matrix polysaccharide synthesis and secretion by pea cells. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 147-161

ROBINSON, D.G., QUADER, H. (1981): Towards cellulose synthesis *in vitro* from plant extracts. J. Theor. Biol. 92, 483-495

ROBINSON, D.G., QUADER, H. (1982): The microtubule-microfibrille syndrome. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. C.W. Lloyd (Ed.). Academic Press, London, New York. P. 109-126

ROBINSON, D.G., EBERLE, M., HAFEMANN, C., WIENECKE, K., GRAEBE, J.E. (1982): Mg^{2+}-shifting of plasma membrane associated glucan synthetase activity. Z. Planzenphysiol. 105, 323-330

ROBINSON, D.G., GLAS, R. (1983): The glucan synthases from suspension cultured sugar cane cells. J. Exp. Botany 34, 668-675

ROBINSON, D.G., ANDREAE, M., SAUER, A. (1985): Hydroxyproline-rich glycoprotein biosynthesis: a comparison with that of collagen. In: Biochemistry of Plant Cell Walls. Brett, C.T., HILLMANN, J.R. (Eds.), Cambridge University Press. P. 155-176

ROTHMAN, J.E. (1981): The Golgi apparatus: two organelles in tandem. Science 213, 1212-1219

SAMSON, M.R., KLIS, F.M., SIGON, C.A.M., STEGWEE, D. (1983): Localization of arabinogalactan proteins in the membrane system of etiolated hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* L. Planta 159, 322-328

SAMSON, M.R., JONGENEEL, R., KLIS, F.M. (1984): Arabinogalctan protein in the extracellular space of *Phaseolus vulgaris* hypocotyl. Phytochem. 23, 493-496

SASAKI, K. (1983): Changes in neutral sugar compositions of cell wall polysaccharides during redifferentiation of cultured carrot cells and during maturation of soybean seeds. Plant Cell Physiol. 24, 811-821

SASAKI, K., MAEDA, M., OHIRA, K. (1980): Comparative studies of the neutral sugar composition of cell wall polysaccharides between cultured cells and mother plant tissues of soybean and carrot. Plant Cell Physiol. 21. 265-278

SAUER, A., ROBINSON, D.G. (1985): Intracellular localization of posttranslational modifications in the synthesis of hydroxyproline-rich glycoproteins. Peptidyl proline hydroxylation in maize roots. Planta 164, 287-294

SCHIBECI, A., FINCHER, G.B., STONE, B.A., WARDROP, A.B. (1982): Isolation of plasma membrane from protoplasts of *Lolium multiflorum* (ryegrass) endosperm cells. Biochem. J. 205, 511-519

SCHMIDT, R., ACKERMANN, R., KRATKY, Z., WASSERMAN, B., JACOBSON, B. (1983): Fast and efficient purification of yeast plasma membranes using cationic silica microbeads. Biochim. Bioph. Acta 732, 421-427

SCHNEPF, E., WITTE, O., RUDOLPH, U., DEICHGRÄBER, G., REISS, H.-D. (1985): Tip cell growth and the frequency and distribution of particle rosettes in the plasmalemma: Experimental studies in *Funaria* protonema cells. Protoplasma 127, 222-229

SEITZ, H.U., SEITZ, U., ALFERMANN, W. (1985): Pflanzliche Gewebekultur. Ein Praktikum. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

SEITZ, H.U., INGOLD, E., LANGEBARTELS, C. (1986): Zellwand-regeneration bei Protoplasten und Biochemie der Zell-wandsynthese. Biol. Rund. 24, 239-255

SELVENDRAN, R.R. (1985): Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. In: The cell surface in plant growth and development. J. Cell Sci., Suppl. 2, 51-88

SELVENDRAN, R.R., DAVIES, A.M.C., TIDDER, E. (1975): Cell wall glycoproteins and polysaccharides of mature runner beans. Phytochem. 14, 2169-2174

SHANNON, P.R.M., FLOOD, A.E., WAIN, R.L. (1984): Auxin-induced cell expansion of potato tuber and chicory root: role of hydroxyproline synthesis. Physiol. Plant. 62, 201-208

SMITH, J.J., MULDOON, E.P., LAMPORT, D.T.A. (1984): Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. Phytochem. 23, 1233-1239

STAFSTROM, J.P., STAEHELIN, L.A. (1986a): Cross-linking patterns in salt-extractable extensin from carrot cell walls. Plant Physiol. 81, 234-241

STAFSTROM, J.P., STAEHELIN, L.A. (1986b): The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation. Plant Physiol. 81, 242-246

STEVENS, B.J.H., SELVENDRAN, R.R. (1984): Structural features of cell-wall polysaccharides of the carrot *Daucus carota*. Carboh. Res. 128, 321-333

STUART, D.A., VARNER, J.E. (1980): Purification and characterization of salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot discs. Plant Physiol. 66, 787-792

TAIZ, L. (1984): Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 585-657

TAIZ, L., MURRY, M., ROBINSON, D.G. (1983): Identification of secretory vesicles in homogenates of pea stem segments. Planta 158, 534-539

TAKEUCHI, Y., KOMAMINE, A. (1978a): Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured *Vinca rosea* cells during culture. Physiol. Plant. 42, 21-28

TAKEUCHI, Y., KOMAMINE, A. (1978b): Composition of the cell wall formed by protoplasts isolated from cell suspension cultures of *Vinca rosea*. Planta 140, 227-232

TAKEUCHI, Y., KOMAMINE, A. (1981): Glucans in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts. Plant Cell Physiol. 22, 1585-1594

TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W.D., ALBERSHEIM, P. (1973): The structure of plant cell walls I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycomore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiol. 51, 158-173

TOWNSEND, C.O. (1897): Der Einfluß des Zellkerns auf die Bildung der Zellhaut. Jahrbuch Wiss. Bot. 30, 484-510

UEMURA, M., YOSHIDA, S. (1983): Isolation and identification of plasma membrane from light-grown winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). Plant Physiol. 73, 586-597

UPDEGRAFF, D.M. (1969): Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. 32, 420-424

VAN DER VALK, H.C.P.M. (1984): Determination of proteases in isolated washed protoplasts: Inactivation of proteases in cell wall-degrading enzyme mixtures used in protoplast isolation. Plant Sci. Lett. 36, 201-204

VAN HOLST, G.-J., VARNER, J.E. (1984): Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root. Plant Physiol. 74, 247-251

VIAN, B., REIS, D., MOSINIAK, M., ROLAND, J.C. (1986): The glucuronoxylans and the helicoidal shift in cellulose microfibrils in linden wood: cytochemistry *in muro* and on isolated molecules. Protoplasma 131, 185-199

WADA, M., STAEHELIN, L.A. (1981): Freeze-fracture observations on the plasma membrane, the cell wall and the cuticle of growing protonemata of *Adiantum capillus-veneris* L. Planta 151, 462-468

WALDRON, K.W., BRETT, C.T. (1985): Interaction of enzymes involved in cell-wall heteropolysaccharide biosynthesis. In: Biochemistry of Plant Cell Walls. Brett, C.T., Hillmann, J.R. (Eds.), Cambridge University Press. P. 79-97

WALTON, J.D., RAY, P.M. (1982): Auxin controls Golgi-localized glucan synthetase activity in the maize mesocotyl. Planta 156, 309-313

WALTON, J.D., EARLE, E.D. (1985): Stimulation of extracellular polysaccharide synthesis in oat protoplasts by the host-specific phytotoxin victorin. Planta 165, 407-415

WASSERMAN, B.P., JACOBSON, B.S., SCHMIDT, R., KRATKY, Z., POOLE, R.J. (1984): Evaluation of the silica microbead method for isolation of red beet protoplast plasma membrane sheets. Biochim. Biophys. Acta 775, 54-63

WIDELL, S., LUNDBORG, T., LARSSON, C. (1982): Purification plasma membranes by phase partition. In: Plasmalemma and Tonoplast: Their Function in the Plant Cell. Marme, D., Marre, E., Hertel, R. (Eds.), Elsevier. P. 121-128

WIENECKE, K., GLAS, R., ROBISON, D.G. (1982): Organelles involved in the synthesis and transport of hydroxyproline-containing glycoproteins in carrot root discs. Planta 155, 58-63

WILKIE, K.C.B. (1985): New perspectives on non-cellulosic cell-wall polysaccharides (hemicelluloses and pectic substances) of land plants. In: Biochemistry of Plant Cell Walls. Brett, C.T., Hillman, J.R. (Eds.), Cambridge University Press. P. 1-37

WILLISON, J.H.M., KLEIN, A.S. (1982): Cell-wall regeneration by protoplasts isolated from higher plants. In: Cellulose and other Natural Polymer Systems. R.M. Brown Jr. (Ed.), Plenum Press, New York, p. 61-85

WILSON, L.G., FRY, J.C. (1986): Extensin - a major cell wall glycoprotein. Plant, Cell and Environment 9, 239-260

YARIV, J., RAPPORT, M.M., GRAF, L. (1962): The interaction glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. Biochem. J. 85, 383-388

YORK, W.S., DARVILL, A.G., MCNEIL, M., STEVENSON, T.T., ALBERSHEIM, P. (1985): 3-Deoxy-D-Manno-2-Octulonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. Carboh. Res. 138, 109-126

YORK, W.S., DARVILL, A.G., MCNEIL, M., STEVENSON, T.T., ALBERSHEIM, P. (1986): Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. Methods in Enzymology 118, 3-40

YOSHIDA, S., KAWATA, T., UEMURA, M., NIKI, T. (1986): Properties of plasma membrane isolated from chilling-sensitive etiolated seedlings of *Vigna radiata* L. Plant Physiol. 80, 152-160

LEBENSLAUF

Hans-Peter Mock, geboren am 29. Februar 1956 in Schussenried als Sohn der Hausfrau Rosa Mock, geborene Haidorfer, und des Monteurs Johann Mock.

1963 - 1966	Grundschule in Otterswang, Bad Schussenried
1966 - 1975	Gymnasium Aulendorf
26.5. 1975	Abitur
1975 - 1976	Zivildienst
1976 - 1982	Studium der Biologie und Physik für das Lehramt an Gymnasien
1978	Zwischenprüfungen
Oktober 1981	Prüfung im Fach Physik
November 1981- April 1982	Zulassungsarbeit über das Thema: "Isolation und Charakterisierung anthocyanhaltiger Vakuolen aus Zellkulturen von *Daucus carota* L." unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie
Oktober 1982	Prüfung im Fach Biologie
1983 - 1986	Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Prof. Dr. H.U. Seitz
1983 - 1986	Wissenschaftliche Hilfskraft
April 1983 - September 1985	Stipendiat des Cusanuswerkes (Promotionsstipendium)

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Baumann, Bentrup, Berthold, Braun, Bunke, Dobat, Dorka, Drumm, Engelmann, Engels, Frey, Gönnenwein, Gradmann, Grell, Hager, Hartmann, Hemleben, Hübener, Krüger, Kulzer, Lutz, Mack, Meier, Meier-Brook, Mertens, Mickoleit, Möhres, Möllenstedt, Netzel, Oberwinkler, Pfister, Pommer, Rähle, Rundel, Schief, Schwemmle, Schwenk, Seitz, H.U., Seitz, U., Seyffert, Staubert, Strähle, Suhr, Wasner, Weber, Wenk, Wittern

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz für seine Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Bereitschaft zur Diskussion, Ratschläge und die gute Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Frau Simone Klostermann für die Messung von Leitenzymen und Herrn Michael Emmerling für die Hilfe bei der Gaschromatographie.

Mein Dank gilt weiterhin den Kolleginnen und Kollegen des Institutes, die mich bei der Durchführung der Arbeit mit Rat und Tat unterstützten. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Uhle-Schneider, Frau Karl und den Kollegen der Werkstatt und Gärtnerei. Bei Frau Seitz bedanke ich mich für wertvolle Ratschläge zur Kultivierung von Protoplasten.

Bei Herrn Prof. Dr. Jacobson bedanke ich mich für mehrere Präparationen an "microbeads".

Mein Dank gilt vielen weiteren Personen, die auf die eine oder andere Art zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dem Cusanuswerk für die gewährte Förderung.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 06151/21353